

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT  
MÜKOLOOGIA ÕPPETOOL

Adele Puusalu

***Batrachochytrium dendrobatidis* ja teised kahepaiksetel esinevad  
patogeensed seened ning nende levik Eestis**

Magistritöö

Juhendajad: vanemteadur Leho Tedersoo

teadur Riinu Rannap

TARTU 2016

# Sisukord

Kasutatud lühendid .....	3
Sissejuhatus .....	4
1. Kirjanduse ülevaade .....	6
1.1 Kahepaiksetel esinevad haigused.....	6
1.2 Ranaviirus .....	7
1.3 Kütridiomükoos .....	8
1.3.1 <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .....	9
1.3.2 <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> .....	13
2. Eksperimentaalosa.....	15
2.1 Töö eesmärk.....	15
2.2 Materjalid ja meetodid .....	15
2.2.1 Proovide kogumine.....	15
2.2.2 Molekulaarsed analüüsid .....	16
2.2.3 Kvantitatiivne PCR.....	17
2.2.4 Bioinformaatika .....	18
2.2.5 Statistilised analüüsid .....	19
3. Tulemused .....	20
4. Arutelu.....	22
Kokkuvõte .....	27
Summary.....	28
Kasutatud kirjandus .....	29
Kasutatud veebiaadressid .....	40
Tänuõnad.....	41
Lisad .....	42
Lihtlitsents .....	59

## Kasutatud lühendid

Bd- kütridiomükoosi põhjustav liik *Batrachochytrium dendrobatidis*

Bs- kütridiomükoosi põhjustav liik *Batrachochytrium salamandrivorans*

BdGPL- globaalne pansootiline *Batrachochytrium dendrobatidis* mittesuguline liin

OTU - operatsiooniline taksonoomiline ühik

ITS- sisemine transkribeeritud vahe, regioon tuuma ribosomaalse rRNA geenide vahel

## Sissejuhatus

Kahepaiksete arvukus ja levik on vähenenud globaalselt. 2015. aasta seisuga on IUCN-i (ingl *International Union for Conservation of Nature*) andmetel teadaolevatest kahepaiksete liikidest 41% väljasuremise ohus (Van Rooij *et al.*, 2015). Arvukuse vähenemise põhjusteks peetakse sobilike elupaikade vähenemist, invasiivsete liikide sissetoomist ja ülemaailmset kahepaiksete vahendamist nii lemmikloomade müügi kui ka toiduks tarvitamise eesmärgil (Boone *et al.*, 2005). Arvukuse vähenemisele aitab kaasa pidev teedevõrgu tihenemine ja autode hulga suurenemine, mille tagajärjel hukkub palju kahepaikseid sigimisele eelneva rände ajal. Selle ärahoidmiseks viiakse läbi aktsioone, mille käigus kahepaiksed kogutakse tõkendaedade abil ühelt poolt teed kokku ning viiakse seejärel teisele poole teed. Elupaikade hävimise ja killustumise tagajärjel suureneb kahepaiksete asustustihedus säilinud elupaigalaikudel, mistõttu suureneb ka nendevaheline kontakt, mis on peamine haiguste levimise viis (Ohst *et al.*, 2013). Samuti suurendab kahepaiksete vahelist kontakti nende rändeaegne kokkukogumine.

Viimastel aastakümnetel on raporteeritud paljude kahepaiksete populatsioonide väljasuremisest nakkuslike haiguste nagu kütridiomükoos ja ranaviirus tõttu (Gray *et al.*, 2009). Kütridiomükoosi üks põhjustajatest *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) on viinud mitmete kahepaikse liikide väljasuremiseni, nagu näiteks Panama kuldne konn (*Atelopus zeteki*) ja terav-nina päevakonn (*Taudactylus acutirostris*) (Fisher *et al.*, 2009). Viimaste aastate jooksul on Hollandis vähenenud tähniksalamandri (*Salamandra salamandra*) arvukus 96% (der Sluijs *et al.*, 2013). Esialgu ei suudetud põhjust tuvastada, kuni avastati teine *Batrachochytrium* perekonda kuuluv liik *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bs) (Martel *et al.*, 2013).

Ohus ei ole vaid kahepaiksed. Aastal 2007 avastati regulaarse nahkhiirte kontrolli käigus, et tuhanded nahkhiired on haigestunud talveune ajal. Neljal erineval nahkhiire liigil avastati kottseente (*Ascomycota*) hõimkonda kuuluva seene liigi *Pseudogymnoascus destructans* (Minnis & Lindner 2013) infektsioon isendi koonult ning tiiva membraanidelt. Pärast seda on infektsiooni leitud mitmetest talvituskohtadest ning nahkhiirte arvukus piirkonnas on langenud 70% haiguse „valge nina sündroom“ tõttu (ingl *white nose syndrome*) (Blehert *et al.*, 2009).

Ökoloogilised suhted maailmas on muutunud, mis soodustab haiguste ülekannet (Daszak *et al.*, 2000). Pikka aega stabiilses seisus püsinud populatsioonid võivad välja surra kiiremini, kui teadlased suudavad olukorda põhjendada (der Sluijs *et al.*, 2013). Dokumenteerides ja

uurides ülemaailmset kahepaiksete väljasuremise põhjust, teadvustab see ühtlasi ühiskonda kahepaiksete kaitse vajalikkusest (Woodhams *et al.*, 2011). Ülemaailmselt on algatatud projekt „Globaalne Bd kaardistamine“ kaardistamaks Bd levikut ning geneetilist mitmekesisust. Hetkeseis (23.05.2016) näitab, et testitud 40 380 kahepaiksest esines 7425 Bd infektsiooni. Proove on võetud 82-st erinevast riigist, millest 56-s esines Bd (Bd-maps, 2016). Ida-Euroopast on Bd-d varem leitud Venemaalt (Reshetnikov *et al.*, 2014) ning Poolast (Sura *et al.*, 2010). Infektsioone on esinenud Riia loomaaias, kust varem oli võimalik osta endale kahepaikseid lemmikloomaks ning tuua Eestisse. Võimalikke viise, kuidas eluohtlik haigus ka Eestisse võiks levida, on mitmeid.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Kahepaiksetel esinevad haigused

Kahepaiksed erinevad teistest loomadest morfoloogiliselt ja füsioloogiliselt. Haiguste diagnoosimist ning ravi raskendavad puuduvad teadmised kahepaiksetel esinevatest haigustest. Rohkem on informatsiooni kodus peetavatest kahepaiksetest ning neil esinevatest haigustest.

Füüsilise vigastuse või mõne muu haiguse tagajärjel võib kahepaiksel tekkida bakteriaalne infektsioon, mis on eriti problemaatiline lemmikloomana peetavate kahepaiksete seas. Kodus peetavatel ja metsikutel kahepaiksetel on enim tuvastatud bakteriaalset veremürgitust, tuntud ka kui „punase jala“ sündroom (ingl *red leg syndrome*). Tihti on tegemist valediagnoosiga, kuna sümptomid on sarnased kütridiomükoosi ja ranaviiruse infektsiooniga. Kahepaiksetel on tuvastatud mitmete bakterite perekondade näiteks *Flavobacterium*, *Mycobacterium* ja *Chlamydia* poolt põhjustatud infektsioone.

Viirustest on kahepaiksetel kõige rohkem tuvastatud ranaviirusega nakatumist. Kahepaiksetelt on isoleeritud mitmeid teisi viiruseid, kuid nende patogeensus pole senimaani tõestatud (Bayley *et al.*, 2013).

Kahepaiksetel on sagedased patogeensed seened, mis levivad hästi veekeskkonnas. Paljud seened on oportunistid ning käituvad patogeenedena võimaluse korral. Patogeeni ülekande kahepaiksele toimub tavaliselt saastunud keskkonna, klassidevahelise patogeeni ülekande või nahavigastuse kaudu (Seyedmousavi *et al.*, 2013). Hetkel kõige olulisem ja kahepaiksetel enim kirjeldatud seenpatogeeni perekond on *Batrachochytrium* (Densmore & Green, 2007). Lisaks viburseente (*Chytridiomycota*) hõimkonnale põhjustab nõrgenenud immuunsüsteemiga kahepaiksetel perekondade *Mucor* ja *Rhizopus* esindajad haigust nimega mukormükoos (*Mucormycotic*), mille sümptomiteks on verevalumitega sarnanevad sõlmed kahepaikse kõhul (Taylor *et al.*, 1999). Perekonnad: *Phialophora*, *Rhinocladium*, *Fonsecaea*, *Venturiales* ja *Cladosporium* põhjustavad haigust kromomükoos (*Chromomycoses*) juba eelnevalt vigastatud loomadel (Densmore & Green, 2007).

Kahepaiksetel põhjustavad haigusi ka mitmed protistide hulka kuuluvad liigid. Enamus neist näiteks tsiliaadid (*Ciliophora*) ja viburloomad (*Flagellata*) esinevad kahepaiksete seedetraktis ja nahal kommensiaalselt ning haigusi ei põhjusta (Densmore & Green, 2007). Protistide hulka kuuluva klassi *Dermocystida* liikmed tekitavad kahepaiksete seljale tsüstide sarnaseid moodustisi (Feldman *et al.*, 2005). Hetkel alveolaatide (*Alveolata*) hulka määratud

patogeeniga *Perkinsus* morfoloogiliselt sarnane protist (ingl *Perkinsus-like*) põhjustab kullestel surmaga lõppevat haigust, mille tulemusel nende organid paisuvad (Davis *et al.*, 2007).

## 1.2 Ranaviirus

Laia leviku ning kõrge virulentsuse tõttu peetakse kahepaiksetel esinevat ranaviirust üheks kahepaiksete globaalse väljasuremise põhjuseks (Miller *et al.*, 2011). Ranaviirused on suure kaheaheelalise DNA genoomiga ikosaeedrilise kapsliga viirused, mis on suutelised nakatama kõigusoojaseid selgroogseid (Lesbarrères *et al.*, 2012). Haigusega nakatamine toimub otsese viiruse ülekandega haigete kahepaiksete omavahelise kontakti korral, kannibalismi või näiteks toiduga viiruse neelamise tagajärjel (Gray *et al.*, 2009). Viirusega võib nakatuda ka saastunud vee või pinnase kaudu (Brunner *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2009). Veekogus vähendavad ranaviiruse ellujäämise tõenäosust seal elavavad mikroorganismid, kes viirustest toituvad. Viirust kaitseb veekeskkonnas ilmselt kahepaikse nahk, mis infektsiooni tagajärjel kahepaikse seljalt maha koorub koos ranaviiruse virionidega (Johnson & Brunner, 2014). Peremeheta ranaviirus ei püsi kaua virulentsena, kuid veekogu põhjamudas 4 °C juures on suuteline talve üle elama (Munro *et al.*, 2016). Kuivamise korral suudab ranaviirus metallpinnal kaua vastu pidada (Nazir *et al.*, 2012), mis suurendab vajadust desinfitseerida kahepaiksete püüdmiseks vajalikke võrke pärast välitöid. Ranaviirus võib levida keskkonnas ilma tuvastatavaid mass-surmasid põhjustamata (Landsberg *et al.*, 2013).

Ranaviiruse sümptomiteks on haavandiline nahk ja verevalumid skeletilihastel ning erinevatel siseelunditel, eriti maksal (Robert *et al.*, 2005). Lisaks on täheldatud suurt lihasmassi kaotust ning uimasust. Osadel indiviididel on leitud paranenud haavandeid (Teacher *et al.*, 2010), mis viitab kahepaiksete võimele haigusest jagu saada. Ranaviirust on enim avastatud kullese arengujärgus kahepaiksetel ning täiskasvanud isenditel, kellel stressi tõttu on immuunvastuse võime nõrgenenud (Gantress *et al.*, 2003). Enamus ranaviiruse esinemise ettekandeid on tehtud kulleste mass-surmade korral (Miller *et al.*, 2011). Ranaviiruse infektsiooni tuvastamiseks peetakse üheks olulisemaks meetodiks maksaproovide uurimist (Green *et al.*, 2009), mille võtmiseks tuleb loom hukata. Kullese nahalt nahakaape võtmist ning saba lõikamist on näidatud samuti efektiivse haiguse tuvastamise võimalusena, kuid täheldati, et see alahindab ranaviiruse reaalselt esinevust keskkonnas (Gray *et al.*, 2012). Viiruse isoleerimist rakukultuurist ning kapsiidi DNA PCR-i ja sekveneerimist koos valgus- ja elektronmikroskoopiaga peetakse oluliseks haiguse tuvastamise meetodiks (Densmore & Green, 2007).

### 1.3 Kütridiomükoos

Kütridiomükoos on kahepaikse keratiniseerunud nahakudesid hävitav haigus (Voyles *et al.*, 2007), mis mõjutab kahepaiksete populatsioonide arvukust üle maailma (Berger *et al.*, 1998). Kütridiomükoosi üheks põhjustajaks on *Batrachochytrium dendrobatidis*. Maailmas on Bd-d tuvastatud 500 erineval kahepaikse liigil kõigil kontinentidel, kus kahepaikseid esineb (Bielby *et al.*, 2015).

Patogeeni Bd mõju kahepaiksetele on liikide vaheliselt ning isegi sama liigi siseselt indiviiditi täiesti erinev (Van Rooij *et al.*, 2015). Samuti erineb haiguse mõju ka populatsiooniti, sõltudes nii aastaajast kui levikualast ja piirkonnast (Fisher *et al.*, 2009). Esimene kütridiomükoosi juhtum Euroopas raporteeriti ajavahemikul 1997–1999, kui Hispaania rahvuspargis vähenes hariliku köidikonna (*Alytes obstetricans*) arvukus 86%. Rahvuspargist leiti tuhandeid surnud isendeid, kuid sarnast mõju teistele kahepaiksete liikidele ei täheldatud (Bosch *et al.*, 2001).

Võrreldes teiste patogeenidega on seenpatogeenide arvukus viimastel aastakümnetel märgatavalt tõusnud (Fisher *et al.*, 2012). Üheks põhjuseks peetakse globaalset kliima soojenemist, kuigi seost pole suudetud teaduslikult tõestada. Raskendavaks asjaoluks globaalse kliima soojenemise seose tõestamisel on Bd elutsükli sõltuvus temperatuurist (Lenker *et al.*, 2014) ning kahepaiksete nõrgem immuunsüsteem madalatel temperatuuridel, mis mõlemad mõjutavad patogeeni kasvu ja levikut (Piotrowski *et al.*, 2004). Kevadised madalad temperatuurid soodustavad Bd arengut ning kuna kahepaiksete immuunsüsteem on kevadel pärast talveund alla surutud, siis on nad haigustele vastuvõtlikumad (Maniero & Carey, 1997). Suveperioodil, kui temperatuur võib ületada 28 °C künnise, tekib vastupidine efekt. Kahepaikse immuunsüsteem tugevneb ning Bd ei suuda kõrge temperatuuri tõttu ellu jääda (Lenker *et al.*, 2014).

Teiseks haiguste leviku põhjuseks on inimtegevuse intensiivistumine seoses rahvastiku arvu ning liikuvuse suurenemisega. Aegade jooksul on inimeste rände käigus viidud mitmeid patogeenseid liike ühest maailma jaost teise (Fisher *et al.*, 2001). Tänapäeval vahendatakse rahvusvahelises kaubanduses haigus-tolerantseid liike (näiteks suur kannuskonn (*Xenopus laevis*)) koos patogeenidega ühelt mandrilt teisele (Farrer *et al.*, 2011). Seened on elukeskkonna suhtes paindlikud, keskkonnas vastupidavad ja omavad mitut erinevat paljunemisviisi. Need omadused ja laienev inimtegevus, mis võimaldab geograafiliselt lahusolevatel mitesugulistel seene liinidel omavahel uuesti kokku saada, soodustavad



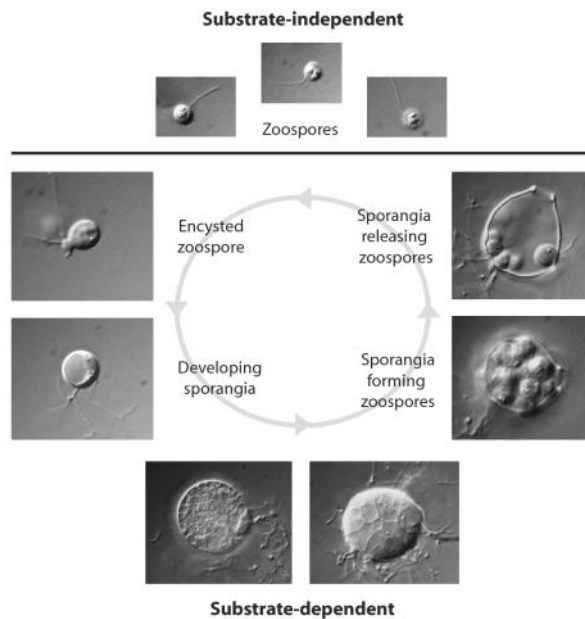
geneetilise materjali vahetust (Fisher *et al.*, 2012), ning rekombinatsiooni tulemusel võib tekkida uus virulentne patogeen (Fisher *et al.*, 2009).

Kahepaiksete erinevate liikide kohastumuskäitumine ning elupaikade valik mõjutab oluliselt Bd infektsiooni tõenäosust. Kahepaiksetel, kes elavad alaliselt veekeskkonnas ning talvituvad veekogu põhjas, on suurem tõenäosus nakatuda Bd-ga (Murphy *et al.*, 2011). Kahepaiksete paljunemiskäitumisest tulenevalt viibivad loomad samas veekogus pikka aega, mis võimaldab infektsiooni intensiivistumist, kuni zoosporide hulk kahepaiksel on jõudnud surmava hulgani. Bd haigestumises pole soo mõju täheldatud, kuid sigimiskäitumisest lähtuvalt veedavad isased veekogus rohkem aega. Emased lahkuvad veekogust pärast kudemist, mille tõttu isasloomad võivad kevadisel ajal rohkem Bd poolt ohustatud olla (Brannelly *et al.*, 2015). Talvitumiseks kahepaiksed varjuvad kas veekogu põhjamutta või maismaale ning isendeid on raske leida. Seetõttu puudub informatsioon Bd mõjust talvituvatele kahepaiksetele (Ouellet *et al.*, 2005)

### **1.3.1 *Batrachochytrium dendrobatidis***

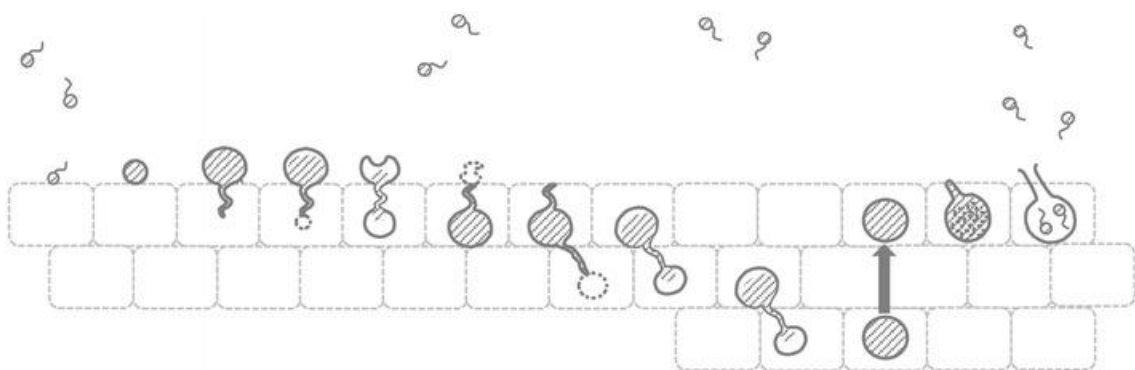
*Batrachochytrium dendrobatidis* on kütridiomükoosi üks peamine põhjustaja (Longcore *et al.*, 1999). Bd kuulub viburseente hõimkonda, mis koosneb pinnases ja vees leiduvatest heterotroofsetest seentest. Enamasti on tegemist sapotroofsete seentega, kes kasutavad elutegevuse käigus substraadina taimejäänuseid, kitiini ja keratiini (Berger *et al.*, 1998). Bd paljuneb kлонаalselt ning seksuaalset reproduktsiooni pole täheldatud (Longcore *et al.*, 1999). Liigil Bd on tuvastatud 6 erinevat liini, mille hulka kuulub ka hüpervirulentne globaalne pansootiline mitesuguline liin (ingl *global panzootic lineage*) BdGPL (Van Rooij *et al.*, 2015), mis leiti 20. sajandil viiel kontinendil (Farrer *et al.*, 2011) ning mis on põhjustanud mitmete kahepaiksete populatsioonide mass-surmasid (Bosch *et al.*, 2001). Loodusest isoleeritud Bd liinidest üle 90% on BdGPL. Arvatakse, et BdGPL ülekaalukuse põhjuseks on hüpervirulentsus (James *et al.*, 2015).

Bd elutsükkel koosneb vabalt ujuvast viburiga zoosporist ning substraadile kinnitunud zoosporangiumist. Zoospor on aktiivne lühikest aega ning võimeline liikuma veekeskkonnas sobiva substraadini (Piotrowski *et al.*, 2004). Idanedes tekib substraadist sõltuv Bd vorm, mille jooksul areneb tallus. Tallusest kasvab üks või mitu zoosporangiumi, milles arenevad uued zoosporid. Küpsed zoosporid vabanevad zoosporangiumist ning võivad nakatada sama peremeesorganismi või naasta tagasi veekeskkonda (Berger *et al.*, 2005). Bd elutsükkel on kujutatud joonisel 1.



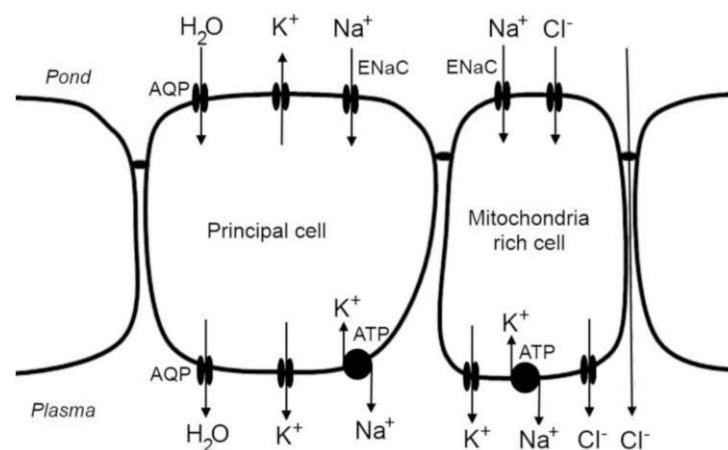
Joonis 1 *Bd* elutsükkel. Substraadist sõltumatul (ingl substrate-independent) eluperioodil on liikumisvõimelised viburiga zoosporid. Substraadist sõltuval (ingl substrate-dependent) eluperioodil, zoosporid arenevad zoosporangiumiks, mis küpsemise järel vabastavad uued zoosporid keskkonda. Joonis on võetud artiklist Rosenblum *et al.* 2008

Zoospor liigub kemotaksise abil keskkonnas keratiini sisalduva koe poole (Garmyn *et al.*, 2012) ning kinnitub kahepaikse naha limakihti (ingl *mucosome*) (Meyer *et al.*, 2007). Limakiht on suuteline esimesel 24 tunni jooksul infektsiooni hulka vähendama, seetõttu on äärmiselt oluline *Bd*-l koloonia moodustamine esimeste 2–4 tunni jooksul. Naha koloniseerimine saavutatakse, kui zoosporist areneb eelniit (ingl *germ tube*), mis tungib läbi kahepaikse naha rakumembraani ning „süstib“ zoosporis oleva geneetilise materjali raku sisse. Eelniidist areneb uus tallus. *Bd* kasutab sama taktikat järjest sügavamatesse naha kihtidesse jõudmiseks (Van Rooij *et al.*, 2012). *Bd* infektsioonitsükli kujutatud joonisel 2. Kliiniliselt väljendub infektsioon välise epidermise liigse paksenemise, raku tsütoplasma degeneratsiooni ja vakuolisatsiooni näol (Berger *et al.*, 1998).



Joonis 2 *Bd* infektsioonitsükkel vastuvõtlikul kahepaiksel. Tsükkel koosneb eelniidi edukas invasioonist naharakku, rakusisese talluse moodustamisest, sügavamatesse rakukihti tungimisest, raku tsütoplasma degeneratsiooni tõttu ülespoole migratsioonist ning lõpuks uute zoosporide vabanemisest. Joonis võetud artiklist Van Rooij *et al.*, 2015

Samaaegselt esineb kahepaiksete käitumises uimasust ja reageerimisvõime langust. Infektsiooni tagajärjel hakkab nahk kestendama (Voyles *et al.*, 2009) ning väheneb rehüdreerimise võime (Carver *et al.*, 2010). Naha kestendamine võimaldab kahepaiksel vabaneda nakatunud koest (Davidson *et al.*, 2003) ning suurendada vee ja elektrolüütide transporti (Voyles *et al.*, 2009). Kahepaikse kõige välimine nahakiht (*stratum corneum*) koosneb keratiniseerunud rakkudest, mis võimaldavad vee liikumist keskkonnast kahepaikse organismi (Lillywhite, 2006). Nahakihist (*stratum corneum*) on leitud kahte tüüpi akvaporiiine AQP-h2 ja AQP-h3 (Hasegawa *et al.*, 2003), mille ülesanne on transportida vett organismi ja säilitada elektrolüütide homöostaas. Vee absorptsioon on lineaarses seoses  $\text{Na}^+$  sissevooluga ja sõltub  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaasi aktiivsusest (joonis 3). Bd infektsiooni tulemusena väheneb  $\text{Na}^+$  absorptsioon läbi kahepaikse naha, mille tulemusena väheneb  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ja  $\text{Cl}^-$  hulk veres.  $\text{K}^+$  ionide puudus tekitab organismis hüpokaleemia, mis infektsiooni lõppjärgus viib asüstooliani ehk südameseiskumiseni (Voyles *et al.*, 2009).



Joonis 3 Ioonide transpordimudel kahepaikse nahakihis (*stratum corneum*). Tiigiveega võrreldes on epiteelrakkude  $\text{Na}^+$  kontsentratsioon madalam, mistõttu liigub  $\text{Na}^+$  tiigiveest läbi apikaalses membraanis asuvate epideelsete  $\text{Na}^+$  kanalite (ENaC) rakku. Sealt edasi vahetatakse liigne  $\text{Na}^+$  plasma  $\text{K}^+$  vastu basaalmembraanis asuvate  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaasi kaudu. Liigne  $\text{K}^+$  rakus liigub tagasi plasmasse läbi basaalmembraani  $\text{K}^+$  kanalite. Selle mehhanismi poolt tekitatud transepiteelne potentsiaalide erinevus viib  $\text{Cl}^-$  absorptsioonini läbi mitokondrite rikaste rakkude.  $\text{NaCl}$  absorptsioon tekitab omakorda osmoose gradiendi, mille tõttu suureneb vee absorptsiooni läbi akvaporiiinide (AQP). Campbell *et al.* 2012

Ensüümid, mis Bd elutegevuse käigus eralduvad, nõrgestavad peremeesorganismi immuunsüsteemi (Joneson *et al.*, 2011), inhibeerides lümfotsüütide arengut ning suunates lümfotsüüte apoptoosi (McMahon *et al.*, 2014). Teatud kahepaiksete liikidel on tuvastatud naha limakihis antimikroobsete peptiidide AMP (ingl *antimicrobial peptides*) tootmist vastusena Bd infektsioonile. Tuvastatud on 40 erineva antimikroobse peptiidi inhibeerivat mõju Bd kasvule (Rollins-Smith 2009). Mitmed bakterid limakihis toodavad infektsiooni vastusena seenevastaseid metaboliite, mis inhibeerivad zoosporide arvu nahal (Brucker *et*

*al.*, 2008). Paljudel Bd vastuvõtlikel liikidel ei teki immunvastust infektsioonile. Lisaks puuduvad tõendid, et vaktsineerimise järgselt tekib immuunvastus (Stice & Briggs, 2010).

Bd infektsiooni vastuse järgi võib peremeesorganismid jagada kolme gruppi: vastuvõtlikud, tolerantid ning resistentsed kahepaiksed (Van Rooij *et al.*, 2015). Tolerantsus väljendub võimes taluda kõrget zoosporide hulka nahal, kuni letaalse piiri saavutamiseni. Resistentsed kahepaiksed suudavad vähendada patogeeni hulka nahal (Schneider & Ayres, 2008). Kahepaiksete liigid erinevad ka zoosporide hulga taluvuse poolest. Teatud liikide puhul piisab kui infektsiooni hulk on ligi 100 zoospori, et isend sureks (Nichols *et al.*, 2001). Eestis esineva hariliku kärnkonna (*Bufo bufo*) puhul on täheldatud, et letaalne hulk on ligi 16 000 zoospori isendi kohta (Bielby *et al.*, 2015). Immuunvastus Bd-le võib osutuda isendile energeetiliselt kulukaks, mis võib väljenduda väiksemas kasvus (Uller *et al.*, 2006), kehvemas keha konditsioonis ning aktiivsuse (Bonneaud *et al.*, 2003), konkurentsi võime (Green *et al.*, 2000) ja paljunemisedukuse languses (Webster & Woolhouse, 1999). Olenevalt infektsiooni põhjustanud Bd zoosporide hulgast võib tolerantse liigi korral isendile surmavaks saada immuunvastuse kulu, mitte haiguse poolt põhjustatud sümptomid (Bielby *et al.*, 2015). Infektsiooni vastuvõtlikkus erineb kahepaiksetel arengufaasiti. Kullestel on täheldatud Bd infektsiooni vaid suu piirkonnas, mis ei ole surmav. Moonde läbi teinud noored kahepaiksed on liigile Bd palju vastuvõtlikumad (Rachowicz & Vredenburg, 2004). Üheks põhjuseks peetakse moonde käigus toimuvat immuunsüsteemi ümberkujunemist, mille tõttu noore kahepaikse immuunsüsteemi kaitse pole piisavalt tugev infektsiooni vastu võitlemiseks (Rollins-Smith *et al.*, 2011).

Hoolimata paljudest uurimustöödest pole suudetud tõestada, kuidas Bd keskkonnas, lisaks peremeesorganismidel parasiteerimisele, säilib. Paljud viburseente hõimkonda kuuluvad liigid on vees elavad sapotroofsed seened (James *et al.*, 2006). Hõimkonnas esineb liike, kellel on tuvastatud paksukestalisi puhkesporangiume, mis on suutelised pikka aega kehvades keskkonnatingimustes vastu pidama. Liigil Bd on leitud tsüstilaadne puhkespori meenutav vorm, kuid pole suudetud tõestada, kas tegemist on puhkesporangiumiga (Rosa *et al.*, 2007). Järvevees suudab Bd elus püsida kuni seitse nädalat ilma peremeesorganismita (Johnson & Speare, 2003). Laboritingimustes on Bd suuteline kuni kolm kuud elus püsima, kasvades niiskel steriliseeritud jõeliival ja steriliseeritud sulgedel, surnud vetikatel ning lüljalgsete skeletil (Johnson & Speare, 2005). Belgias läbiviidud uuringus leiti Bd zoospori Kanada lagle (*Branta canadensis*) ning koduhane (*Anser anser domesticus*) jalasoomustel (Garmyn *et al.*, 2012). Bd on suuteline nakatama varbussi (*Caenorhabditis elegans*), kes võib kahepaikse puudumisel käituda potentsiaalse lisaperemehena (Shapard *et al.*, 2011). Haiguse

reservuaariks võivad olla ka punane soovähk (*Procambarus clarkii*) ja sinine jõevähk (*Procambarus alleni*). Mõlemalt liigilt leiti patogeeni Bd zoospore. Punase soovähi seedetraktist leiti ka Bd zoosporangiume. Infektsioon kestis ligi 12 nädalat ning hiljem toimus ülekanne kahepaiksetele (McMahon *et al.*, 2013). Punane soovähk on Eestis invasiivsete liikide nimekirjas, kuid liiki pole käesoleva ajani Eesti looduses leitud (Keskkonnaministeerium, 2016). Kanada laglesid võib aga rändeperioodil Eestis kohata.

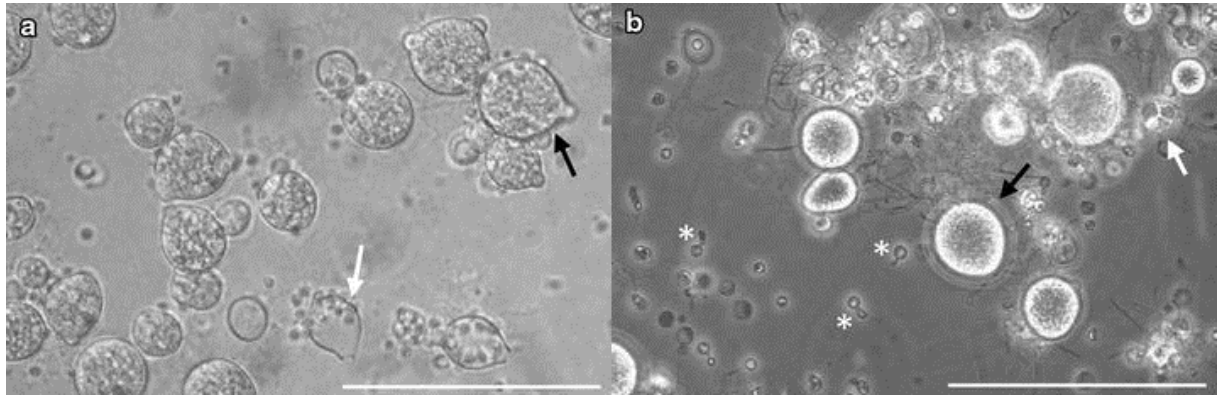
Kullese arengujärgus isendid on Bd reservuaarid. Mõningatel liikidel kulub moondeks aega kuni 18 kuud (Daszak *et al.*, 1999). Osade liikide kullased teevad moonde läbi talve jooksul võimaldades nii Bd-l talve üle elada (Fernández-Beascoetxea *et al.*, 2016). Kahepaiksed, kes on Bd-le väga vastuvõtlikud, näiteks Panama kuldne konn, funktsioneerivad kui Bd levitajad, võimendades seeläbi haiguse ülekannet (DiRenzo *et al.*, 2014). Invasiivsed ja resistentsed liigid võivad funktsioneerida kui Bd reservuaarid, levitades infektsiooni, ilma ise haigestumata. Eestis laialdaselt levinud rohukonn (*Rana temporaria*) kuulub resistentsete liikide hulka, kellel on täheldatud võimet haigusest jagu saada ka suure hulga zoosporide korral (Bielby *et al.*, 2015).

### 1.3.2 *Batrachochytrium salamandrivorans*

Ajavahemikus 2010 kuni 2013 on Hollandis tähniksalamandrite populatsioon vähenenud 96%. Populatsiooni arvukuse langust ei suudetud põhjendada ühegi kahepaiksetel esineva patogeeniga. Kolm aastat hiljem tehti fülogeneetiliste analüüside abil kindlaks, et tegemist on *Batrachochytrium* perekonda kuuluva seni avastamata liigiga *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel *et al.*, 2013). Bs eraldumine liigist Bd toimus umbes 67,3 miljonit aastat tagasi. Kui Bd puhul pole päritolu endiselt teada, siis Bs on Euroopasse levinud Aasiast tõenäoliselt kahepaiksete rahvusvahelise transpordi käigus. Bs suudab nakatada erinevaid sabakonnaliste (*Urodela*) liike ületades liikidevahelised barjäärid (Martel *et al.*, 2014). Euroopa põliste sabakonnaliste populatsioonidele on Bs infektsioon olnud hävitavate tagajärgedega.

Mõlema *Batrachochytrium* perekonna liigi elutsüklil koosneb kahest faasist: liikumisvõimeline zoospor ja substraati kinnitunud liikumatu zoosporangium. Kõige olulisem morfoloogiline erinevus on torujate väljakasvude moodustumine pärast zoosporide kinnitumist *in vitro* ja hulgaliste koloniaalsete talluste moodustumine nii *in vivo* kui ka *in vitro* (Martel *et al.*, 2013). Bd ja Bs-i morfoloogia erinevused toodud joonisel 4. Kui Bd kasvab temperatuurivahemikus 4–28 °C (Longcore *et al.*, 1999), siis Bs-i optimaalne kasv on vahemikus 10–15 °C ning temperatuur  $\geq 25$  °C on surmav. Kahe liigi vaheline optimaalse kasvutemperatuuri erinevus ning tõsiasi, et Bs suudab nakatada vaid sabakonnalisi, viitavad

kahe erineva patogeeni poolt hõivatud erinevatele ökoloogilistele nišsidele (Martel *et al.*, 2013). Näiteks Hispaanias suri mõne aasta jooksul enamus köidikkonna (*Alytes obstetricans*) populatsioonist Bd tõttu (Bosch & Martínez-Solano, 2006), kuid patogeeniga Bs nakatunud isenditel infektsioonile iseloomulikke sümptomeid ei arenenud (Martel *et al.*, 2013).



Joonis 4 Perekonna *Batrachochytrium* morfoloogia kultuuris. **a** Bd kultuur (TGhL) söötmel. Musta noolega on märgitud küps zoosporangium ning selle sees olevad zoosporid. Valge noolega on märgitud zoosporangium, kust osad zoosporid on juba väljunud. **b** Bs kultuur (TGhL) söötmel. Musta noolega on märgitud Bs monotsentriline tallus ja valge noolega on märgitud mõned koloniaalsed tallused ja zoosporid koos eelniidiga. Mõõteskaala 100 µm. Joonis on kohandatud artikli Van Rooij *et al.* 2015 põhjal.

Bs-i poolt põhjustatud kütridiomükoosi sümptomid on sarnased Bd infektsioonile. Katse käigus nakatunud salamandrid surid seitsme päeva jooksul. Infektsiooni jooksul muutusid kahepaiksed apaatsiks, esines anoreksia ja ataksia. Nahal väljendus infektsioon naha pealmise koe erosioonis koos sügavate haavanditega ning nahakestendusega (Martel *et al.*, 2013). Mitmed Aasias levinud salamandrilised võivad olla sobivad Bs reservuaarid, levitades nahakestenduse käigus zoospore ümbritsevasse keskkonda ilma ise nakatumata (Martel *et al.*, 2014).

## **2. Eksperimentaals**

### **2.1 Töö eesmärk**

Magistritöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas Eesti kahepaiksetel esineb patogeeni Bd- või Bs-i ning kas on ka teisi seenpatogeene, kes kahepaiksetel võivad esineda. Töö põhirõhk oli selgeks teha kütridiomükoosi tekitajate esinemine looduslikus keskkonnas, kuna need liigid on põhjustanud mitmete populatsioonide väljasuremist maailmas.

Eesmärgi täitmiseks koguti proove kõigilt Eestis leiduvatelt liikidelt erinevatest Eesti piirkondadest, et määrata kütridiomükoosi tekitajate levik ja võimalik ohtlikkus Eesti kahepaiksetele.

Töö käigus analüüsiti võimalikke Bd reservuaare ning erinevaid leviku viise Eestisse. Teadmine Bd esinemise kohta on oluline nii meie keskkonnakaitse ja liigirikkuse säilimise kui ka ülemaailmse Bd leviku väljaselgitamise jaoks.

### **2.2 Materjalid ja meetodid**

#### **2.2.1 Proovide kogumine**

Kõik Eesti kahepaiksed kuuluvad looduskaitseaduse alusel (RTS-LKS, 2016) riikliku kaitse alla ning kuuluvad I – III kaitsekategooriasse. Kaitsealuseid kahepaikseid ei või looduslikust keskkonnast eemaldada ega neid kahjustada (Adrados *et al.*, 2004).

Bd tuvastamiseks kahepaiksel kasutatakse järgnevat meetodeid: varbalülilikobrukese eemaldamine, nahakaape võtmine ning laboris kahepaikse hoidmist steriilses vees, kust hiljem eraldatakse Bd zoosporid (Hyatt *et al.*, 2007). Lähtudes kahepaiksete kaitsestaatusast valisime proovide korjamise meetodiks nahakaape võtmise kahepaikse nahalt, mis andis kõige paremaid tulemusi erinevate meetodite võrdlemisel ka Hyatt'i töörühma uuringus. Nahakaabe võeti tõmmates üle kahepaikse selja ninast kuni sabakondini, jalgadelt ning kõhu piirkonnast vähemalt 3–5 korda (Hyatt *et al.*, 2007). Kaape võtmiseks kasutati steriilseid vatipulki (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Saksamaa), mida on võimalik sulgeda steriilse korgiga pärast kaape tegemist. Kahepaiksete käsitlemisel kasutati ühekordseid laborikindaid, et vältida võimalike haigustekitajate ülekannet ühelt isendilt teisele ja iseendale. Iga prooviga registreeriti kahepaikse liik, proovi võtmise kuupäev ja asukoha koordinaadid ning tuvastatavuse korral ka kahepaikse vanus ja sugu vastavalt arengujärgule. Lisaks mõõdeti joonlauaga kahepaikse pikkus ninaotsast sabakondini. Pärast proovide võtmist asetati loomad tagasi elukeskkonda. Välitöö lõpus avati proovide korgid tekitades väike õhuava ning jäeti

kuivama varjulisse kohta, et vältida niiskete proovide hallitama minemist. Pärast kuivamist suleti proov kuni laboratoorsete analüüsideni. Kuivanult säilib Bd DNA proovil vähemalt 18 kuud (Hyatt *et al.*, 2007). Vahemikus 12.05.2014–12.10.2015 (joonis 5) koguti 315 proovi: 245 korjati vabalt looduses olevatelt kahepaiksetelt neist 2 välismaalt (üks Taanist ning üks Andorrast), 59 koguti Riia loomaaiast, 9 Tallinna loomaaiast ning 2 kodus peetavatelt kahepaiksetelt Eestis (tabel 1). Proove koguti kümnelt liigilt üheteistkümnest (joonis 6), kes on kantud Eesti looduse nimistusse (proove ei kogutud rohekärnkonnalt (*Bufo viridiae*), pole viimastel aastatel Eestist leitud). Vesilikud koondati ühte gruppi, kuna harivesilikult (*Triturus cristatus*) õnnestus proov võtta vaid ühel korral. Kõik „rohelised“ konnad liikidest *Rana lessonae*, *Rana esculenta* ja *Rana ridibunda* tõsteti ühte gruppi, et vältida liikide omavahelisest sigimisest tulenevate hübriidsete isendite valesestimääramist (Adrados *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Molekulaarsed analüüsid

Kogutud proovidest DNA eraldamiseks eemaldati steriilse skalpelliga vatipulga vatt võimalikult õhukese lõikena ning asetati pintsettide abil steriilsesse 1,5 ml tuubi. Pärast iga proovi eemaldamist kasteti skalpell ja pintsetid 70% EtOH lahusesse ning asetati piirituspõleti leeki, kus lasti alkoholil ära põleda. Proovi sisaldavasse tuupi pipeteeriti 200 µl Solis 10 x DNA lüüsipuhvrit (Solis Biodyne, Tartu, Eesti) (Anslan & Tedersoo, 2015), kuhu eelnevalt oli lisatud 5 µl ensüümi proteinaas K (Thermo Scientific, USA, Massachusetts). Proovid asetati üheks minutiks tsentrifuugi ning pärast seda veenduti visuaalselt, et kogu proovis olev materjal on täielikult lüüsilahuse sees. Seejärel asetati proovid termostaati 56 °C juurde ning jäeti sinna üleöö. Hommikul tõsteti termostaadi temperatuur 98 °C juurde 15 minutiks, et deaktiveerida proteinaas K. DNA eralduse viimases etapis eemaldati pipeti abil tuubist kõik suspensioon uute 1,5 ml tuubi ning jäeti 4 °C juurde seisma. DNA eraldusele järgnes polümeraasne ahelreaktsioon (ingl *polymerase chain reaction*; PCR), mis oli ettevalmistav osa sekveneerimiseks. PCR reaktsioonisegu proovi kohta koosnes järgmistest komponentidest: 18 µl dH<sub>2</sub>O, 5 µl *Hot FirePol Blend Mastermix* (Solis BioDyne, Tartu, Eesti), 0,5 µl päri- ja vastassuunalist praimerisegu (100 µM) ning 1 µl (1:10) vees lahjendatud DNA-d. Pärisuunalise praimerina kasutati ITS3tagmix (Roche, Basel, Šveits), mis koosnes 19-st erinevast praimerist (L. Tedersoo, avaldamata andmed). Vastassuunalise praimerina kasutati ITS4ngs (Roche, Basel, Šveits), mis koosnes 107-st erinevast määramisligandiga praimerist, mis erinesid teineteisest vähemalt 3 aluspaari poolest (L. Tedersoo, avaldamata andmed; tabel 2). Praimerite abil amplifitseeriti ITS 2 regioon (ingl *internal transcribed spacer*; ITS) tuuma ribosomaalse rRNA geenide vahel. PCR jaoks kasutati programmi, mis koosnes kolmest etapist: 1) 15 minutit 95 °C juures, mis on vajalik DNA



ahelate denatureerimiseks, 2) 30 sekundit 55 °C juures, mille jooksul toimub praimeride seondumine DNA üksikahelale ja 3) 1 minutit 72 °C juures, mille jooksul sünteesitakse uus DNA ahel. Kui kõik kordustsüklid lõpetati, toimus viimase etapina 72 °C juures 10 minuti jooksul poolleiolevate ahelate lõpuni sünteesimine. PCR jaoks kasutati erinevaid tsüklite arvu vastavalt sünteesitud DNA produktide tugevusele. Esialgu kasutati kõikide proovide korral 35 tsüklit koosnevat PCR-i programmi, mille käigus sünteesiti umbes 450 bp pikkused DNA fragmendid PCR masinas (Eppendorf Mastercycler Pro; Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). DNA fragmentide olemasolu ja hulka kontrolliti geelelektroforeesil, milleks kasutati 1% agarosgeeli etiidumbromiidiga ning 1x TBE puhvrit. Tulemuse visualiseerimiseks asetati geel 280 nm UV-kappi ning pildistati. Vastavalt produkti tugevusele geelpildil suurendati või vähendati PCR tsüklite arvu kordus-PCR käigus: 25 tsüklit (tugev produkt), 28 tsüklit (keskmise tugevusega produkt) ja 40 tsüklit (väga nõrk produkt). Kui kõik PCR proovid olid optimeeritud, järgnes PCR produktide kokku pipeteerimine kolme sekveneerimistuubi ning puhastamine *FavorPrep GEL/PCR Purification Kit* abil vastavalt tootja poolt soovitatud protokollile (FavorPrep, Viin, Austria). Puhastamisele järgnes DNA kontsentratsiooni mõõtmine igas tuubis kasutades kitti *Qubit dsDNA HS Assay Kit*; (Invitrogen, LifeTechnologies, California, USA) ning *Qubit 2.0* fluorimeetrit (Invitrogen, Life Technologies, California, USA). DNA sadestamiseks lisati hulgas 9:10 3M Na-atsetaadile 1:10 hulgas DNA-d ning 2 µl DNA sademe värvimisainet *Pellet Paint* (Novagen, Darmstadt, Saksamaa). Lahus viidi 96% külma etanooliga (-20 °C) 2,5 milliliitrini ning segati 5 sekundi jooksul ja jäeti üleöö -20 °C juurde. Hommikul tsentrifuugiti DNA 4 °C juures 20 minutit, mille tulemusena DNA jäi tuubi põhja. DNA-l lasti 5 minuti jooksul kuivada ning seejärel lahustati 80 µl destilleeritud autoklaavitud vees. Viimane etapp, DNA sekveneerimine, viidi läbi Tartu Ülikooli ja Biokeskuse Genoomika tippkeskuses Tartus, kasutades *Illumina TruSeq PCR-free* ligeerimisprotokolli ja DNA adaptereid ning *MiSeq* sekvenaatorit 2 x 300 *paired-end* keemiaga (Illumina, San Diego, USA) (Tedersoo *et al.*, 2015).

### 2.2.3 Kvantitatiivne PCR

Kvantitatiivset PCR-i (ingl quantitative PCR; qPCR) kasutatakse *Bd* tuvastamiseks aastast 2004. Tegemist on kiire ja sensitiivse diagnostikameetodiga, mis on suuteline tuvastama *Bd* infektsiooni väga varajases staadiumis. Meetodi jaoks kasutati spetsiifilised *Bd* praimerid ning parimate tulemuste saamiseks soovitatakse kasutada toodet *TaqMan PCR assay* (Boyle *et al.*, 2004).

Kvantitatiivse PCR-i tegemiseks saadet igast proovist 15 µl DNA lahust 0.2 ml suletud tuubis Inglismaale. Transpordiks kasutati termokarpi ning jääplokke, et hoida proove sobiva temperatuuri juures. Kvantitatiivne PCR viidi läbi Londonis St. Mary's Kuningliku Kolledži (ingl *St. Mary's Imperial College*) Nakkuslike Haiguste Epidemioloogia osakonnas (ingl *Department of Infectious Disease Epidemiology*) väljatöötatud protokollil alusel. Kvantitatiivse PCR-i käigus valiti 315 proovist välja 68 proovi (tabel 1), mis oli võetud looduslikust keskkonnast ning kõik proovid, mis olid korjatud loomaaedadest.

#### 2.2.4 Bioinformaatika

Sekveneerimise tulemusena saadi 4 519 612 järjestust. Kvaliteedi alusel filtreeriti DNA järjestused programmi *mothur* (Schloss *et al.*, 2009) abiga. Käsuga *maxambig=0* eemaldati tundmatute nukleotiididega (N) järjestused ning käskudega *qwindowaverage=30* ja *qwindowsize=15* eemaldati madala kvaliteediga ( $\geq 29$ ) järjestused. Liiga lühikesed järjestused eemaldati käsuga *minlength=150* ning kõik sekventsids määrati praimerid määramisligandi alusel proovideks. *PandaSeq Assembler* abiga seoti saadud järjestused omavahel kokku määrates minimaalseks kattuvuseks 25 aluspaari (Masella *et al.*, 2012). Programmeerimiskeelt *Python* (versioon 2.7) kasutades eemaldati mittepaardunud järjestused ja artefaktid, kus praimerite järjestus ei paiknenud 3' või 5'otsas (Bálint *et al.*, 2014). Programmi *ITS extractor* abil eemaldati ITS 2 regiooniga külgnevad alad (18S, 5.8S 28S) rühmitamise efektiivsuse suurendamise eesmärgil (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013). Programmi *Usearch v8* meetodiga *denovo* filtreeriti saadud sekventsijärjestustest välja kõik kimäärsed sekventsids (Edgar, 2010). Täispikad ITS2 järjestused rühmitati vastavalt liigilisele kuuluvusele 97% sarnasuse alusel, kasutades programmi CD-HIT (Fu *et al.*, 2012). Rühmitamise tulemusena saadi 27 588 taksonoomilist ühikut ehk OTU-t (ingl *operational taxonomic unit*; OTU). Iga rühma puhul valiti üks esinduslik sekvents, mida esines arvuliselt kõige enam ning võrreldi UNITE (Abarenkov *et al.*, 2010) ning NCBI (National Center for Biotechnology Information) Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) andmebaaside vastu kasutades BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides*) algoritmi (Altschul *et al.*, 1990). Saadud OTU-de tabelis määrati kõik taksonoomilised üksused, mille e-väärtus oli  $\leq e^{-20}$ , kategooriasse „tundmatu“. Üksused, mille e-väärtus jäi vahemikku  $e^{-20}$ – $e^{-50}$  kontrolliti, tehes uus BLASTn otsing NCBI andmebaasi vastu. OTU-de määramisel perekonna, sugukonna, seltsi või klassi tasemel kasutati otsingutulemustel saadud sarnasusprotsenti ning e-väärtust. Sarnasuse aluseks võeti vastavalt 90%; 85%; 80%; 75%. Vältimaks liigset liigirikkust tulenevalt uue põlvkonna sekveneerimisandmetest, eemaldati kõik OTU-d, milles esines üks sekvents (Tedersoo *et al.*, 2014). Seejärel jaotati kõik proovid vastavat taksonoomilise kuuluvuse järgi järgmistesse kategooriatesse: seened (*Fungi*); loomad

(*Metazoa*); taimed (*Viridiplantae*); vetikad (*Heterokonta*) ning protistid (*Protozoa*). Kogutud 315-st proovist 15-l oli sekventsides arv proovis väiksem kui 1200, mille tõttu need proovid eemaldati edasistest analüüsides. Bd esinemise korral määrati proov positiivseks, kui BLASTn otsing NCBI andmebaasi vastu andis tulemuseks sarnasusprotsendi 100% (Canestrelli *et al.*, 2013). ning esimesed 50 vastet ei sisaldanud teisi organisme, kui Bd.

### 2.2.5 Statistilised analüüsid

OTU-de andmete põhjal leidsin järgnevad statistilised parameetrid: keskmise väärtuse, sekventsipikkuse mediaani, standardhälve (SD).

Prevalents (ingl *prevalence*) ehk hetke haigestumuse proportsioon on esitatud protsentides. Prevalents väljendub haigestunud peremeeste arvuga, mis on jagatud kõigi antud töös uurimise all olevate isendite arvuga. Prevalentsi leidmine kirjeldab kõige praemini patoloogi esinemist või puudumist keskkonnas (Bush *et al.*, 1997). Prevalentsi 95% usaldusintervall on leitud järgneva valemiga:

$$p \pm z\sqrt{p(1-p)/n}, \quad (1)$$

kus  $p$  on prevalents,  $n$  on kogutud proovide arv ja  $z = 1.96$  (0.975 usaldusnivoo standardsest normaaljaotusest). Negatiivse usalduspiiri korral võrdsustati see nulliga.

Seoste leidmiseks keskkonna parameetrite (proovide kogumise aasta ja koht, looduslikust keskkonnast kogutud proovide korral koordinaadid, kahepaikse liik) ning organismide koosluste struktuuri muutuste vahel kasutati programmi Permanova+ (Terlizzi *et al.*, 2005). Esmalt transformeeriti sekventsides arvulised väärtused vastavalt valemile  $\log(x+1)$  ja kasutades Bray-Curtis sarnasust (ingl *Bray-Curtis similarity*). Programmi Permanova+ funktsiooni DISTLM kasutades leiti parimad mitmekesisust seletavad mudelid korrigeeritud Akaike informatsiooni kriteeriumi (AICc) alusel. Kirjeldavate statistikute ( $F_{\text{pseudo}}$  ja P-väärtused) ja determinatsioonikordajate ( $R^2$ ,  $R^2_{\text{adjusted, cumulative}}$ ) saamiseks kasutati eespidist valikut (*forward selection*). Analüüsi teostati vastavalt sekventsides kuulumisele gruppidesse: loomad, taimed, seened, vetikad, protistid. Lisaks teostati eraldi analüüsid Bd ning viburseente hõimkonna jaoks.

### 3. Tulemused

Lõplik sekventsideside arv proovidest oli 3 738 484 mediaanpikkusega 296 aluspaari, mis määrati 24 807 OTU-ks. Keskmiselt oli proovi kohta 11883 (SD= 13417, kõige vähem= 57, kõige rohkem=132 591) sekventsia ja 211 (SD=154, kõige vähem=22, kõige rohkem=1326) OTU-t. Kõikidest OTU-dest 61% kuulus seeneriiki (*Fungi*), 17% kuulus protistide (*Protozoa*), 6% taimede (*Viridiplantae*), 5% loomade (*Metazoa*) ja 2% vetikaliste (*Heterokonta*) gruppi. Kõigist proovidest leitud OTU-de hulgast 10% polnud võimalik määrata ühtegi taksonisse ning liigitati seetõttu gruppi „tundmatud“ (joonis 7).

Töö peamine eesmärk oli tuvastada, kas Eesti kahepaiksetel esineb globaalselt levinud liike Bd või Bs. Sekveneerimistulemused andsid vasteks 52 erinevat OTU-t, mille taksonoomiline vaste oli Bd. Uuritav perekond *Batrachochytrium* moodustas viburseente hõimkonna sekventsideside hulgast 7% (joonis 8). Kogutud 315-st proovist 21-s esines vähemalt kaks sekventsia proovi kohta. Selleks, et vältida sekveneerimisest tulenevat viga, võeti edasisse statistilisse analüüsi proovid, kus sekventsideside arv oli  $\geq 4$  sekventsia proovi kohta, jättes lõplikusse analüüsi 14 ehk 4.7% 300-st proovist. Kahepaiksetest oli kõigil liikidel vähemalt üks Bd positiivne proov, välja arvatud harilikul kärnkonnal (tabel 1). Bs kohta ei leitud ühtegi vastet.

Lisaks kütridiomükoosi tekitajatele leiti mukormükoosi (*Mucormycotic*) põhjustajaid perekonnast *Mucor* (89 OTU-t) 67-st proovist ning perekonna *Rhizopus* esindajaid (8 OTU-t) 7-st proovist. Kromomükoosi (*Chromomycoses*) põhjustajaid perekonnast *Phialophora* leidis 33-s proovis (17 OTU-t), perekonnast *Rhinocladium* esindajaid 8-s proovis (22 OTU-t), *Venturiales* esindajaid leiti 33-s proovis (38 OTU-t), perekonna *Fonsecaea* esindajaid ei leitud ühtegi ning perekonda *Cladosporium* leiti 297-s proovil (109 erinevat OTU-t). Hetkel alveolaatide (*Alveolata*) hulka määratud patogeeni *Perkinsus* sarnast protisti ning kahepaiksete seljanahale tsüstide laadseid moodustisi tekitava klassi *Dermocystida* liikmed ei leitud. Lisaks haigutekitajatele arvutati ka üldine organismide protsentuaalne jaotuvus kahepaiksete nahal (joonis 9–12).

Iga haigusetekitaja kohta arvutati eraldi haigestumise proportsioon ehk prevalents. Kütridiomükoosi puhul jäi proportsioon vahemikku 3,1%–12,5% (tabel 3). Haiguse mukormükoosi põhjustaja perekonna *Mucor* puhul jäi prevalents vahemikku 6,3%–33,3% (tabel 4) ning perekonna *Rhizopus* puhul vahemikku 1,4%–7,7% (tabel 5). Kromomükoosi põhjustajate perekonna *Phialophora* prevalents jäi vahemikku 3,4%–20,5% (tabel 6), perekonna *Rhinocladium* prevalents jäi vahemikku 4,2%–22,2% (tabel 7), seltsi *Venturiales*

prevalents jäi vahemikku 6,8%–21,9% ja *Cladosporiumi* prevalents jäi vahemikku 87,5%–100% (tabel 9). Nendesse perekondadesse kuuluvad ka mittepatogeensed liigid, kuid sarnasusprotsendi alusel ei olnud võimalik antud perekondi liigini määrata.

Keskkonna parameetrite ning organismide koosluste vahelise analüüsi tulemusel esines grupis seened nõrk seos looduslikust keskkonnast korjatud proovide vahel (4%). Lisaks esines nõrk seos (2%) aasta vahel, mil proov korjati. Grupis protistid esines väga nõrk seos looduslikust keskkonnast korjatud proovide vahel (1%). Liikidest eristub grupi protistide koosluse poolest jutt-selg kärnkonn nõrga seosega (2%). Bd esinemise puhul leiti seos looduslikust keskkonnast kogutud proovide vahel 17% (tabel 10). Keskkonna parameetrite ning organismide koosluste vahel ei õnnestunud seoseid leida järgmistes gruppides: loomad, vetikad, viburseened.

Kõik kvantitatiivse PCR abil analüüsitud proovid osutusid negatiivseks. Proov määrati negatiivseks, kui GE (ingl *genomic equivalent*) väärtus oli madalam kui 0.1. GE väärtus on võrdväärne seene DNA hulgaga ühes infekteerivas zoosporis (Bielby *et al.*, 2015). Analüüsitud qPCR proovidest 8 osutusid sekveneerimistulemusi arvestades Bd positiivseks.

## 4. Arutelu

Alates Bd avastamisest tänapäevani ei teata täpselt, kust infektsioon alguse sai (James *et al.*, 2015). Esialgu arvati, et Bd on pärit Aafrikast ning levis tänu Aafrika suure kannuskonna ülemaailmsele transpordile (Weldon *et al.*, 2004). Pärast uute mittesuguliste Bd liinide avastamist erinevatest maailmajagudest on jõutud järeldusele, et patogeen on laialdasemalt levinud kui esialgu arvati ning enamik mass-surma juhtumeid on põhjustatud hüpervirulentse liini *BdGPL* poolt. Seetõttu on mass-surmade ja Bd leviku kaardistamine oluline. Enamus kaardistatud levialade näol on olnud tegemist juba laialdase infektsiooniga, mille põhjustajaks oli liin *BdGPL*. Piirkondade uurimine, mis on näiliselt infektsioonivabad või kus liigi Bd prevalents on madal, annavad meile olulist informatsiooni. Tegemist võib olla piirkonnaga, kuhu Bd pole kunagi levinud või piirkonnaga, millel esinevad spetsiifilised keskkonna tingimused, mis piiravad Bd levikut. Piirkond võib olla ka näiliselt infektsioonivaba, kus Bd levikut pole väheste proovide kogumise tõttu suudetud näidata (James *et al.*, 2015). Piirkonna iseloomustamine Bd leviku seisukohalt on oluline, et jõuda lähemale vastusele, kust liik pärineb ning millised keskkonna tingimused soodustasid hüpervirulentse liini teket.

Balti riikides, sealhulgas Eestis, pole Bd levikut varasemalt kaardistatud. Lätist on liiki Bd leitud loomaaias. Selleks, et Eestit saaks Bd esinemise järgi liigitada, kas infektsiooni vabaks või madala Bd prevalentsiga alaks oli esialgu vajalik koguda proovid ning need analüüsida. Eestis esinevad Bd poolt põhjustatud mass-surma juhtumid võivad jääda tähelepanuta, sest surnud kahepaiksed süüakse ära nekrofaagide poolt või nende kehad lagundatakse veekeskkonnas mikroorganismide abil liiga kiiresti ja ilma tähelepanu äratamata (Skerratt *et al.*, 2007). Uurimustöö ajal kogutud proovide sekveneerimistulemuste põhjal võib väita, et Bd esineb Eestis nii Põhja-, Lõuna- kui Lääne-Eestis välja arvatud Ida- ja Kesk-Eestis ning saartel. See, et Ida- ja Kesk-Eestis ei tuvastatud uurimustöö käigus Bd ei saa väita, et nende Eesti piirkondade näol on tegemist Bd vabade aladega. Võimalik, et infektsiooniga loomadelt ei õnnestunud proove koguda või antud piirkondades koguti proove liiga vähe (Muletz *et al.*, 2014).

Enim Bd positiivseid proove oli liikidel rabakonn (*Rana arvalis*) ja rohukonn. Rohukonn on uuringute põhjal määratud Bd resistentseks liigiks ning infektsioon sellel liigil kütridiomükoosi sümptomite näol ei väljendu (Bielby *et al.*, 2015). Euroopa andmebaasi Bd-maps (Bd-maps, 2016) andmetel on rohukonna prevalents isegi madalam (2,7%), kui Eestist kogutud proovide põhjal analüüsiti. Rabakonna puhul on Euroopast varasemalt Bd-maps andmebaasi andmetel kogutud proove vaid kaks, millest üks oli positiivne. Kuna rabakonn ja rohukonn kuuluvad ühte perekonda (*Rana*) ning eluviisilt on tegemist sarnaste liikidega, siis

võib eeldada, et ka rabakonn on resistentne liik. Samasse sugukonda (*Ranidae*) kuuluvatel „rohelistel“ konnade gruppi paigutatud liikidel (*Rana esculenta*, *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*) esines üks positiivne proov. Andmebaasi Bd-maps andmetel on varasemalt Euroopas kogutud proovide prevalents 13,2%, mis on kõrgem kui teistel meil esinevatel liikidel. Varasemate uuringute põhjal on „rohelised“ konnad liigitatud tolerantsete liikide alla (Woodhams *et al.*, 2012).

Kõrgeim Eesti proovide prevalents 12,5% oli mudakonnal (*Pelobates fuscus*), mis on tingitud väikesest valimi hulgast. Kuna tegemist on varjuva ja öise eluviisiga kahepaiksega, siis proove õnnestus koguda 8 isendilt. Euroopast on korjatud andmebaasi Bd-maps andmetel vaid üks proov, mis osutus negatiivseks. Varasemate uuringute puudumine ning vähene proovide arv uurimustöös ei võimalda määrata mudakonna ohustatuse staatust Bd poolt.

Harilikul kärnkonnal ei olnud ühtegi Bd positiivset proovi. Andmebaasi Bd-maps andmetel on Euroopas hariliku kärnkonna prevalents madal (4,3%), kuigi tegemist on Eestis esinevatest liikidest Euroopas enim proove kogutud kahepaiksega (2082). Perekonda (*Bufo*) kuuluva teise liigi jutt-selg kärnkonnal (*Bufo calamita*) oli kaks Bd positiivset proovi, kuid prevalents osutus madalamaks (5,3%), kui andmebaasi Bd-maps andmetel Euroopas kogutud proovide puhul (9%). Harilik kärnkonn kuulub Bd tolerantsete liikide hulka (Bielby *et al.*, 2015), nagu ka jutt-selg kärnkonn (Savage & Zamudio, 2016).

Vesilikelt (*Triturus cristatus*, *Triturus vulgaris*) koguti üks positiivne Bd proov. Prevalents nii Eestis kui ka Euroopas kogutud proovidel on 3,1%, mis on sarnane varem avaldatud uurimustöödega (Ohst *et al.*, 2013) ning võimalik, et tegemist on Bd tolerantse liigiga, kuigi varasemad sellealased uurimustööd puuduvad.

Kõik Eestis esinevad kahepaiksed on IUCN-i andmete (ingl *International Union for Conservation of Nature*) järgi hinnatud patogeeni Bd nakatumise ohu järgi gruppi *least concerned* ehk nende ohustatust on hinnatud, kuid pole piisavalt põhjust neid teise kategooriasse paigutada (IUCN-ASG, 2016). Patogeenil Bd esineb grupiefekt, see tähendab, et üksikud zoosporid ei suuda kultuuris kasvada, kuid suurema grupi korral suudab patogeen kasvada ka kehvades tingimustes (Longcore *et al.*, 1999). Arvatavasti Eestis esinevad resistentsed liigid suudavad zoosporide taset hoida madalal, pärssides nii grupiefekti tekkimist. Sellest tulenevalt on Eestis enim ohustatud tolerantset liigid, näiteks harilik kärnkonn või jutt-selg kärnkonn, kellele Bd võib surmavalt mõjuda teatud hulga zoosporidega nakatumise tagajärjel. Sobivaim aeg selleks on kevad, sest sigimiskäitumisest

tulenevalt veedavad kärnkonnalised pikka aega ühes veekogus võimaldades nii Bd infektsiooni hulgal suureneda surmava koguseni (Brannelly *et al.*, 2015).

Varasemalt on Eesti kahepaiksete Bd prevalentsiks hinnatud rohkem kui 70% (Patrelle *et al.*, 2012). Uurimustöös käsitletud proovide keskmine prevalents aga oli 6,3%, mis on palju madalam hinnatud prevalentsist. Soomes tehtud uurimustöö tulemused, Eestiga sarnase prevalentsi piirkonnas osutusid aga hoopis Bd suhtes negatiivseks (Patrelle *et al.*, 2012).

Prevalentsi varieeruvus sõltub proovide kogumise ajast, aastaajast (Berger *et al.*, 2004), temperatuurist, vihmaaju hulgast ja kõrgusest merepinnast (Patrelle *et al.*, 2012). Senimaani käsitlemata küsimus on pikkade ja külmade talvede mõju Bd ellujäämisele. Infektsioonid Venemaal ning Poolas viitavad sellele, et Bd on võimeline teatud tingimustel üle elama külmema talve, kuid kuidas see mõjutab patogeenide hulka väliskeskkonnas on senimaani teadmata. Võimalik, et Eesti ja Soome piirkonna varasemalt hinnatud prevalents on palju väiksem tänu madalatele külmakraadidele (-20 °C) talvel, mis mõjuvad keskkonnale desinfitseerivalt.

Sekveneerimistulemuste põhjal leiti 14 Bd positiivset proovi, kuid Inglismaal läbi viidud qPCR kõik tulemused olid negatiivsed. Tulemuste erinevuse põhjusi on mitmeid. Välitöödel looduslikkust keskkonnast kogutud proovidel esines mulda, mis võib inhibeerida qPCR-i, tulemusi vähendades analüüsi spetsiifilisust ning võib anda valenegatiivseid tulemusi (Ohst *et al.*, 2013). Selle vältimiseks kasutati sisemist positiivset kontrolli (ingl *internal positive controls*), mis peaks tuvastama inhibiitorite esinemise proovis. Inhibiitorite esinemise korral soovitatakse vähendada DNA kontsentratsiooni proovis (Hyatt *et al.*, 2007), mis niigi madala Bd zoosporide hulga korral vähendab kvantitatiivselt mõõdetava DNA hulka ning lõpuks võib viia valenegatiivse tulemuseni. Lisaks on täheldatud, et nahakaape võtmise abil DNA kogumine ei anna Bd hulga kohta isendil usaldusväärset tulemust ning tihtipeale alahindab Bd esinemise prevalentsi (Shin *et al.*, 2014). Veel sõltub Bd DNA hulk proovi korjamise hetkel kahepaikse naha niiskusest. Kuuma ja kuiva päeval võib zoosporide eraldumine zoosporangiumist aeglustuda kehva keskkonnatingimuste tõttu, sest kuivades tingimustes sureb zoospor kiiresti (Johnson & Speare, 2003). Infektsiooni algustaadiumis, kui zoosporist on arenenud juba zoosporangium, sõltub mõõdetava infektsiooni hulk sellest, mitmendal infektsiooni päeval kahepaiksel proov koguti. Proovi korjamine Bd zoosporangiumi küpsemise päeval võimaldab nahakaape abil koguda suurema hulga Bd DNA-d. Hiljuti avaldatud artiklis soovitatakse varasema seljapiirkonna asemel teha nahakaabe kahepaikse kõhu alumisest piirkonnast, vaagnaluu lähedalt ning tagajalgadelt. Need piirkonnad kahepaiksel puutuvad rohkem kokku keskkonnas esineva niiskusega,



vältides seetõttu kuivamisest tulevat zoosporide vähesust (Clare *et al.*, 2016). Eestis esineva Bd puhul pole kindel, millise mittesugulise liiniga on tegemist, kuna antud uurimustöös määrati vaid esinemist keskkonnas ja ei sekveneeritud tervet genoomi. Kui Eestis esineval liinil on praimerid või sonid (ingl *probe*) seondumiskoha aluspaarides polümorfismi, siis qPCR efektiivsus ja spetsiifilisus võib väheneda või üldse puududa (Farrer *et al.*, 2011). Varasemalt on täheldatud, et erinevad DNA eralduses kasutatavad lahused on andnud erinevaid qPCR tulemusi, mis võib ka antud uurimustöös olla valenegatiivsete proovide põhjuseks (Ohst *et al.*, 2013).

Mukormükoosi tekitajad perekondades *Mucor* ja *Rhizopus* on laialt levinud niisketes keskkondades, mullas ning kõdunevas materjalis. Infektsioon tekib pärast spooride sissehingamist või allaneelamist nõrgenenud immuunsüsteemiga kahepaiksetel ning samuti füüsilise vigastuse tagajärjel (Taylor *et al.*, 1999). Lõputöös analüüsitud kahepaiksetel ei esinenud mukormükoosi sümptomeid, millest võib järeldada, et tegemist oli tervete loomadega. Kromomükoosi põhjustajaid leiti mitmest perekonnast, kuid ka nende puhul on tegemist tavaliselt pinnases leiduvate seentega. Infektsioon saab tekkida vaid eelnevalt vigastatud kahepaiksel (Densmore & Green, 2007), mis välistab antud uurimustöös kogutud proovid. Arvestades perekonna *Cladosporium* kõrget prevalentssi 87,5–100%, siis ilmselt on tegemist kahepaiksete naha mikroflooras esineva seenega, mis võimaluse korral võib tekitada infektsiooni.

Kahepaiksete looduslikust keskkonnast proovidele lisaks koguti proove ka Tallinna ning Riia kahepaiksetelt. Loomaaias on võimalik kohata mitmeid eksootilisi liike, näiteks Aafrika kannuskonn, kes kuulub Bd tolerantsete liikide hulka ning kelle kaasabil Bd on maailmas levinud (Weldon *et al.*, 2004). Inimesed, kes peavad kahepaikseid lemmikloomadena, võivad eksootilisi kahepaikseid erinevate kokkulepete alusel just loomaaiast. Lisaks tuuakse loomaaedadesse ka kõik toidu, näiteks banaanide transpordi käigus teise riiki sattunud kahepaiksed. Pealtnäha terved loomad võivad retsessiivsete või tolerantsete liikidena levitada Bd teistele liikidele loomaaias. Loodusesse võib patogeen sattuda vivaariumi sisu vahetamise käigus, mis pahaaimamatult komposteeritakse looduslikku keskkonda.

Riia loomaaiast on Eestisse toodud mitmeid kahepaikseid lemmikloomadeks. Loomaaedade kahepaiksete vahetamise käigus selgus, et neil esineb Bd infektsioon. Kogutud proovide analüüsil leiti kolmel kahepaiksel Bd positiivsed proovid. Kõigile kahepaiksetele tehakse Riia loomaaias profülaktilist ravi, kuna neil puuduvad võimalused Bd testimiseks. Keskmise prevalentssi Riia loomaaias oli 5,1%, millest võib järeldada, et keskkonnas esineb Bd, kuid tänu

ravile suudetakse infektsiooni hoida kontrolli all. Pärast Bd avastamist pole kahepaikseid tsiviilisikutele müüdud. Tallinna loomaaia ei kogutud ühtegi Bd positiivset proovi.

## Kokkuvõte

Viimastel aastakümnetel on täheldatud mitmete kahepaiksete liikide populatsioonide kahanemist. See võib olla tingitud mitmetest teguritest, näiteks üldine kliimamuutus, inimasustuse tihenemine või mõne patogeeni levikuga. Ühtedeks selliseks patogeeniks on globaalselt levinud *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) ja Euroopasse hiljuti sisse toodud *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bs). Need seenpatogeenid on juba mitmel pool maailmas põhjustanud kahepaiksete populatsioonide tugevat vähenemist või lausa väljasuremist.

Peamiseks uurimustöö eesmärgiks oli välja selgitada Eesti kahepaiksetel esinevad võimalikud seenpatogeenid, sealhulgas globaalselt levinud Bd ja Euroopasse hiljuti sisse toodud Bs. Samuti hinnata erinevate seenpatogeenide mõju Eestis esinevatele kahepaiksete liikidele ning kaardistada positiivsete proovide korral kütridiomükoosi levik Eestis. Lisaks sooviti välja selgitada sisse toodavate kahepaiksete mõju Bd levikule Eestis.

Kahe aasta jooksul koguti proove üle terve Eesti ning ka Tallinna ja Riia loomaaiast. Selle aja jooksul koguti 315 proovi, mida analüüsiti kasutades sekveneerimismeetodit. Eesti kahepaiksetest kuuel liigil leiti sekveneerimistulemuste põhjal Bd-d. Bd positiivseid proove oli kogutud mitmest erinevast Eesti piirkonnast. Enamus Bd positiivsed proovid analüüsiti ka kasutades qPCR meetodit. Teist kütridiomükoosi põhjustavat liiki Bs sekveneerimistulemusi arvestades ei leitud, mis tähendab, et Eestisse pole Bs veel levinud või uurimustöö valim oli liiga väike.

Kahepaiksete seisund, pidades silmas erinevaid seenpatogeene, on uurimustöö põhjal hea. Hoolimata mitmete oportunistlikest patogeenide esinemisest proovides ei täheldatud kahepaiksetel haiglaslikku käitumist, mis viitaks patogeensele infektsioonile. Sekveneerimistulemuste põhjal võib väita, et Eesti näol on tegemist madala Bd prevalentsi piirkonnaga, mis võib olla tingitud seni määramata keskkonnateguritest või Eestis esinevate kahepaiksete resistentsusest või tolerantsusest patogeeni Bd vastu. Kuna qPCR-i tulemused olid kõik negatiivsed, siis võiks üleüldist Bd leviku kaardistamist silmas pidades tähendada, et Eesti võib olla üks neist piirkondadest, kus Bd-d ei esine.

Hoolimata kahe DNA eraldusele järgneva analüüsi tulemuste erinevusest võib väita, et Eesti kahepaiksete populatsioonid ei ole ohustatud kütridiomükoosi tekitajate ega ka muude uurimustöös käsitletud seenpatogeenide poolt.

# **Occurrence and distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other amphibian pathogenic fungi in Estonia**

Adele Puusalu

## **Summary**

Over the past few decades there has been a decrease in populations of many different amphibians species worldwide. There could be many reasons for example global climate change, increase in human activity or outbreak of some pathogen. Globally distributed *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) and recently introduced *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bs) in Europe, are pathogens that cause chytridiomycosis infection resulting mass die-offs or even extinction of many amphibians' populations in the World.

The aim of this study was to find out whether Estonian amphibians show infection of Bd and Bs or other fungal pathogens. Furthermore, evaluate the impact of different fungal pathogens on Estonian amphibians and map the distribution of Bd if detected. Another purpose was to estimate the contribution of imported amphibians in Bd spreading in Estonia.

Within two years, samples were collected from all over Estonia and also from the zoos of Tallinn and Riga. Altogether 315 skin swab samples were analyzed using massively parallel Illumina sequencing. Six species of Estonian amphibians tested positive for Bd according to the sequencing data. Bd positive samples were found from different locations in Estonia. The Bd positive samples were also analyzed using qPCR, but these results turned out to be negative. The second pathogen, Bs, was not detected in any of the samples.

According to the present study, the Estonian amphibians support low abundance of Bd, but are free from heavy infections. Although, many opportunistic pathogens were detected, no sign of abnormal behaviour was noted in the sampled specimens. Therefore, there is no reason to suspect any pathogenic infection. There may be many reasons for the low Bd prevalence in Estonia for example, certain undetermined environment condition(s) that inhibit Bd spreading or Estonian amphibians are presumably resistant or tolerant to the pathogen. When only qPCR results are evaluated, which were all negative, then Estonia could be considered as an essentially Bd free country.

Despite the fact that the results differed between the two different analysis performed after DNA extraction, it still could be concluded that Estonian amphibian populations are not endangered by chytridiomycosis infection nor other fungal pathogens determined in this work.

## Kasutatud kirjandus

Abarenkov, K., Nilsson, H., Larsson, K.-H., Alexander, I., J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølter, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A., R., S., Tedersoo, L., Ursing, B., M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., Kõljalg, U. 2010. "The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi-Recent Updates and Future Perspectives." *The New phytologist* 186(2): 281–85.

Adrados, L., C., Rannap, R., Briggs, L. 2004. *Kahepaiksete Välimääraja*.- Tartu Ülikooli Ökoloogia ja Maateaduste Instituut, Tallinn

Anslan, S., and Tedersoo L. 2015. "Performance of Cytochrome c Oxidase Subunit I (COI), Ribosomal DNA Large Subunit (LSU) and Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in DNA Barcoding of Collembola." *European Journal of Soil Biology* 69: 1–7.

Altschul S., F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., W., Lipman, D., J. (1990). Basic local alignment search tool *Journal of Molecular Biology* 215:403-410

Bálint, M., Schmidt, P., A., Sharma, R., Thines, M., Schmitt, I. 2014. "An Illumina Metabarcoding Pipeline for Fungi." *Ecology and Evolution* 4(13): 2642–53.

Bayley, A., E., Hill, B., J., Feist, S., W. 2013. "Susceptibility of the European Common Frog *Rana Temporaria* to a Panel of Ranavirus Isolates from Fish and Amphibian Hosts." *Diseases of Aquatic Organisms* 103(3): 171–83.

Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., de Sousa, F., Amend, A., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand, Y., J., K., Sanli, K., Eriksson, K., M., Vik, U., Veldre, V., Nilsson, R., H. 2013. "Improved Software Detection and Extraction of ITS1 and ITS2 from Ribosomal ITS Sequences of Fungi and Other Eukaryotes for Analysis of Environmental Sequencing Data." *Methods in Ecology and Evolution* 4(10): 914–19.

Berger, L et al. 1998. "Chytridiomycosis Causes Amphibian Mortality Associated with Population Declines in the Rain Forests of Australia and Central America." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(15): 9031–36.

Berger, L., Speare, R., Hines, H., B., Marantelli, G., Hyatt, A., D., McDonald, K., R., Skerratt, L., F., Olsen, V., Clarke, J., M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C., Tyler, M., J. 2004. "Effect of Season and Temperature on Mortality in Amphibians due to Chytridiomycosis." *Australian Veterinary Journal* 82(7): 434–39.

- Berger, Lee, Alex D. Hyatt, Rick Speare, and Joyce E. Longcore. 2005. "Life Cycle Stages of the Amphibian Chytrid *Batrachochytrium Dendrobatidis*." *Diseases of Aquatic Organisms* 68(1): 51–63.
- Bielby, J., Fisher, M., C., Clare, F., C., Rosa, G., M., Garner, T., W., J. 2015. "Host Species Vary in Infection Probability, Sub-Lethal Effects, and Costs of Immune Response When Exposed to an Amphibian Parasite." *Scientific reports* 5(April): 10828.
- Blehert, D., S., Hicks, A., C., Behr, M., Meteyer, C., U., Berlowski-Zier, B., M., Buckles, E., L., Coleman, J., T., Darling, S., R., Gargas, A., Niver, R., Okoniewski, J., C., Rudd, R., J., Stone, W., B. 2009. "Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen?" *Science* 323(5911): 227.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G. 2003. "Assessing the Cost of Mounting an Immune Response." *The American naturalist* 161(3): 367–79.
- Boone, M., D., Boone, M., D., Cowman, D., Davidson, C., Hayes, T., Hopkins, W., Relyea, R., Schiesari, L., Semlitsch, R. 2005. IUCN - The World Conservation Union Evaluating the Role of Environmental Contamination in Amphibian Population Declines. In: Gascon C.; Collins J. P.; Moore, R. D; Church, D. R.; McKay, J. E.; Mendelson III, J. R. 2005. *Amphibian Conservation Action Plan*.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I., García-París, M. 2001. "Evidence of a Chytrid Fungus Infection Involved in the Decline of the Common Midwife Toad (*Alytes obstetricans*) in Protected Areas of Central Spain." *Biological Conservation* 97(3): 331–37.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. 2006. "Chytrid Fungus Infection Related to Unusual Mortalities of *Salamandra atra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain." *Oryx* 40(1): 84–89.
- Boyle, D., G., Boyle, D., B., Olsen, V., Morgan, J., A., T., Hyatt, A., D. 2004. "Rapid Quantitative Detection of Chytridiomycosis (*Batrachochytrium Dendrobatidis*) in Amphibian Samples Using Real-Time Taqman PCR Assay." *Diseases of Aquatic Organisms* 60(2): 141–48.
- Brannelly, L., A., Hunter, D., A., Lenger, D., Scheele, B., C., Skerratt, L., F., Berger, L. 2015. "Dynamics of Chytridiomycosis during the Breeding Season in an Australian Alpine Amphibian." *PloS ONE* (DECEMBER): In Press.

- Brucker, R., M., Harris, R., N., Schwantes, C., R., Gallaher, T., N., Flaherty, D., C., Lam, B., A., Minbiole, K., P., C. 2008. "Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium Lividum* on the Salamander *Plethodon Cinereus*." *Journal of Chemical Ecology* 34(11): 1422–29.
- Brunner, J., L., Schock, D., M., Collins, J., P. 2007. "Transmission Dynamics of the Amphibian *Ranavirus Ambystoma Tigrinum* Virus." *Diseases of Aquatic Organisms* 77(2): 87–95.
- Bush, A., O., Lafferty, K., D., Lotz, J., M., Shostak, A., W. 1997. "Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et Al. Revisited." *The Journal of parasitology* 83(4): 575–83.
- Campbell, C., R., Voyles, J., Cook, D., I., Dinudom, A. 2012. "Frog Skin Epithelium: Electolyte Transport and Chytridiomycosis." *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology* 44(3): 431–34
- Canestrelli, D., Zampiglia, M., Nascetti, G. 2013. "Widespread Occurrence of *Batrachochytrium Dendrobatidis* in Contemporary and Historical Samples of the Endangered *Bombina Pachypus* along the Italian Peninsula." *PLoS ONE* 8(5).
- Carver, S., Bell, B., D., Waldman, B. 2010. "Does Chytridiomycosis Disrupt Amphibian Skin Function?" *Source: Copeia* (3): 487–95.
- Clare, F., Daniel, O., Garner, T., Fisher, M. 2016. "Assessing the Ability of Swab Data to Determine the True Burden of Infection for the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium Dendrobatidis*." *EcoHealth*: 13-52.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A., A., Hyatt, A., D., Green, D., E., Speare, R. 1999. "Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines." *Emerging infectious diseases* 5(6): 735–48.
- Daszak, P., Cunningham, A., A., Hyatt, A., D. 2000. "Emerging Infectious Diseases of Wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health." *Science* 287(January): 443–49.
- Davidson, E., W., Parris, M., Collins, J., P., Longcore, J., E., Pessier, A., P., Brunner, J. 2003. "Pathogenicity and Transmission of Chytridiomycosis in Tiger Salamanders (*Ambystoma Tigrinum*)." *Copeia* 2003(3): 601–7.
- Davis, A., K., Yabsley, M., J., Keel, K., M., Maerz, J., C. 2007. "Discovery of a Novel

- Alveolate Pathogen Affecting Southern Leopard Frogs in Georgia: Description of the Disease and Host Effects.” *EcoHealth* 4(3): 310–17.
- Densmore, C., L. & Green D., E. 2007. “Diseases of Amphibians.” *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 48(3): 235–54.
- DiRenzo, G., V., Langhammer, P., F., Zamudio K., R., Lips, K. R. 2014. “Fungal Infection Intensity and Zoospore Output of *Atelopus Zeteki*, a Potential Acute Chytrid Supershedder.” *PLoS ONE* 9(3): 1–6.
- Edgar, R., C. 2010. “Search and Clustering Orders of Magnitude Faster than BLAST.” *Bioinformatics* 26(19): 2460–61.
- Farrer, R., A., Weinert, L., A., Bielby, J., Garner, T., W., J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A., A., Weldon, C., du Preez, L., H., Anderson, L., Pond, S., L., K., Shahar-Golan, R., Henk, D., A., Fisher, M., C. 2011. “Multiple Emergences of Genetically Diverse Amphibian-Infecting Chytrids Include a Globalized Hypervirulent Recombinant Lineage.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(46): 18732–36.
- Feldman, S., H., Wimsatt, J., H., Green, D., Earl. 2005. “Phylogenetic Classification of the Frog Pathogen *Amphibiothecum* (*Dermosporidium*) Penneri Based on Small Ribosomal Subunit Sequencing.” *Journal of Wildlife Diseases* 41(4): 701–6.
- Fernández-Beaskoetxea, S., Bosch, J., Bielby, J. 2016. “Infection and Transmission Heterogeneity of a Multi-Host Pathogen (*Batrachochytrium Dendrobatidis*) within an Amphibian Community.” *Diseases of Aquatic Organisms* 118(1): 11–20.
- Fisher, M., C., Koenig, G., L., White, T., J., San-Blas, G., Negroni, R., Alvarez, I., G., Wanke, B., Taylor, J., W. 2001. “Biogeographic Range Expansion into South America by *Coccidioides Immitis* Mirrors New World Patterns of Human Migration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(8): 4558–62.
- Fisher, M., C., Garner, T., W., J., Walker, S., F. 2009. “Global Emergence of *Batrachochytrium Dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host.” *Annual review of microbiology* 63: 291–310.
- Fisher, M., C., Henk, D., A., Briggs, C., J., Brownstein, J., S., Madoff, L., C., McCraw, S., L., Gurr, S., J. 2012. “Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health.” *Nature* 484(7393): 186–94.



- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., Li, W. 2012. "CD-HIT: Accelerated for Clustering the next-Generation Sequencing Data." *Bioinformatics* 28(23): 3150–52.
- Gantress, J., Maniero, G., D., Cohen, N., Robert, J. 2003. "Development and Characterization of a Model System to Study Amphibian Immune Responses to Iridoviruses." *Virology* 311(2): 254–62.
- Garmyn, A., Van Rooij, P., Pasmans, F., Hellebuyck, T., Van Den Broeck, W., Haesebrouck, F., Martel, A. 2012. "Waterfowl: Potential Environmental Reservoirs of the Chytrid Fungus *Batrachochytrium Dendrobatidis*." *PLoS ONE* 7(4): 1–5.
- Gray, M., J., Miller, D., L., Hoverman, J., T. 2009. "Ecology and Pathology of Amphibian Ranaviruses." *Diseases of Aquatic Organisms* 87(3): 243–66.
- Gray, M., J., Miller, D., L., Hoverman, J., T. 2012. "Reliability of Non-Lethal Surveillance Methods for Detecting Ranavirus Infection." *Diseases of Aquatic Organisms* 99(1): 1–6.
- Green, D., M., Kraaijeveld, A., R., Godfray, H., C., J. 2000. "Evolutionary Interactions between *Drosophila Melanogaster* and Its Parasitoid *Asobara Tabida*." *Heredity* 85(5): 450–58.
- Green, D., E., Gray, M., J., Miller, D., L. 2009. "Disease Monitoring and Biosecurity." *Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques*: 481–506.
- Hasegawa, T., Tanii, H., Suzuki, M., Tanaka, S. 2003. "Regulation of Water Absorption in the Frog Skins by Two Vasotocin-Dependent Water-Channel Aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3." *Endocrinology* 144(9): 4087–96.
- Hyatt, A., D., Boyle, D., G., Olsen, V., Boyle, D., B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., Colling, A. 2007. "Diagnostic Assays and Sampling Protocols for the Detection of *Batrachochytrium Dendrobatidis*." *Diseases of Aquatic Organisms* 73(3): 175–92.
- James, T., Y., Letcher, P., M., Longcore, J., E., Mozley-Standridge, S., E., Porter, D., Powell, M., J., Griffith, G., W., Vilgalys, R. 2006. "A Molecular Phylogeny of the Flagellated Fungi (Chytridiomycota) and Description of a New Phylum (Blastocladiomycota)." *Mycologia* 98(6): 860–71.
- James, T., Y., Toledo, L., F., Rödder, D., da Silva Leite, D., Belasen, A., M., Betancourt-Roman, C., M., Jenkinson, T., S., Soto-Azat, C., Lambertini, C., Longo, A., V., Ruggeri, J.,

- Collins, J., P., Burrowes, P., A., Lips, K., R., Zamudio, K., R., Longcore, J., E. 2015. "Disentangling Host, Pathogen, and Environmental Determinants of a Recently Emerged Wildlife Disease: Lessons from the First 15 Years of Amphibian Chytridiomycosis Research." *Ecology and Evolution* 5(18): 4079–97.
- Johnson, M., L. & Speare, R. 2003. "Survival of *Batrachochytrium Dendrobatidis* in Water: Quarantine and Disease Control Implications." *Emerging Infectious Diseases* 9(8): 922–25.
- Johnson, M., L., Speare, R. 2005. "Possible Modes of Dissemination of the Amphibian Chytrid *Batrachochytrium Dendrobatidis* in the Environment." *Diseases of Aquatic Organisms* 65(3): 181–86.
- Johnson, A., F. & Brunner J., L. 2014. "Persistence of an Amphibian Ranavirus in Aquatic Communities." *Diseases of Aquatic Organisms* 111(2): 129–38.
- Joneson, S., Stajich, J., E., Shiu, S., H., Rosenblum, E., B. 2011. "Genomic Transition to Pathogenicity in Chytrid Fungi." *PLoS Pathogens* 7(11).
- Landsberg, J., H., Kiryu, Y., Tabuchi, M., Waltzek, T., B., Enge, K., M., Reintjes-Tolen, S., Preston, A., Pessier, A., P. 2013. "Co-Infection by Alveolate Parasites and Frog Virus 3-like Ranavirus during an Amphibian Larval Mortality Event in Florida, USA." *Diseases of Aquatic Organisms* 105(2): 89–99.
- Lenker, M., A., Savage, A., E., Becker, C., G., Rodriguez, D., Zamudio, K., R. 2014. "*Batrachochytrium Dendrobatidis* Infection Dynamics Vary Seasonally in Upstate New York, USA." *Diseases of Aquatic Organisms* 111(1): 51–60.
- Lesbarrères, D., Balseiro, A., Brunner, J., Chinchar, V., G., Duffus, A., Kerby, J., Miller, D., L., Robert, J., Schock, D., M., Waltzek, T., Gray, M., J. 2012. "Ranavirus: Past, Present and Future." *Biology letters* 8(4): 481–83.
- Lillywhite, H., B. 2006. "Water Relations of Tetrapod Integument." *The Journal of experimental biology* 209(Pt 2): 202–26.
- Longcore, J., E., Pessier, A., P., Nichols, D., K. 1999. "*Batrachochytrium Dendrobatidis* gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians." *Mycologia* 91(2): 219–27.
- Maniero, G., D., & Carey, C. 1997. "Changes in Selected Aspects of Immune Function in the Leopard Frog, *Rana pipiens*, Associated with Exposure to Cold." *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 167(4): 256–63.

- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M., C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F., Pasmans, F. 2013. “*Batrachochytrium Salamandrivorans* sp. nov. Causes Lethal Chytridiomycosis in Amphibians.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(38): 15325–29.
- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M., C., Farrer, R., A., Schmidt, B., R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K., R., Muletz, C., Zamudio, K., R., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T., W., J., Cunningham, A., A., Spitzen-van der Sluijs, A., Salvidio, S., Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T., T., Kolby, J., E., Van Bocxlaer, I., Bossuyt, F., Pasmans, F. 2014. “Recent Introduction of a Chytrid Fungus Endangers Western Palearctic Salamanders.” Science 346(6209): 630–31.
- Masella, A., P., Bartram, A., K., Truszkowski, J., M., Brown, D., G., Neufeld, J., D. 2012. “PANDAsq: Paired-End Assembler for Illumina Sequences.” BMC Bioinformatics 13(1): 1–
- McMahon, T., A., Brannelly, L., A., Chatfield, M., W., H., Johnson, P., T., J., Joseph, M., B., McKenzie, V., J., Richards-Zawacki, C., L., Venesky, M., D., Rohr, J., R. 2013. “Chytrid Fungus *Batrachochytrium Dendrobatidis* Has Nonamphibian Hosts and Releases Chemicals That Cause Pathology in the Absence of Infection.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(1): 210–15.
- McMahon, T., A., Sears, B., F., Venesky, M., D., Bessler, S., M., Brown, J., M., Deutsch, K., Halstead, N., T., Lentz, G., Tenouri, N., Young, S., Civitello, D., J., Ortega, N., Fites, J., S., Reinert, L., K., Rollins-Smith, L., A., Raffel, T., R., Rohr, J., R. 2014. “Amphibians Acquire Resistance to Live and Dead Fungus Overcoming Fungal Immunosuppression.” Nature 511(7508): 224–27.
- Meyer, W., Seegers, U., Schnapper, A., Neuhaus, H., Himstedt, W., Toepfer-Petersen, E. 2007. “Possible Antimicrobial Defense by Free Sugars on the Epidermal Surface of Aquatic Vertebrates.” Aquatic Biology 1(2): 167–75.
- Miller, D., Gray, M., Storfer, A. 2011. “Ecopathology of Ranaviruses Infecting Amphibians.” Viruses 3(11): 2351–73.
- Minnis, A., M., Lindner, D., L. 2013. “Phylogenetic Evaluation of Geomyces and Allies Reveals No Close Relatives of Pseudogymnoascus destructans, Comb. nov., Inbat Hibernacula of Eastern North America.” Fungal Biology 117(9): 638–49.
- Muletz, C., Caruso, N., M., Fleischer, R., C., McDiarmid, R., W., Lips, K., R. 2014.

- “Unexpected Rarity of the Pathogen *Batrachochytrium Dendrobatidis* in Appalachian Plethodon Salamanders: 1957-2011.” PLoS ONE 9(8).
- Munro, J., Bayley, A., E., McPherson, N., J., Feist, S., W. 2016. “Survival of Frog Virus 3 in Freshwater and Sediment from an English Lake.” Journal of Wildlife Diseases 52(1): 138–42.
- Murphy, P., J., St.-Hilaire, S., Corn, P., S. 2011. “Temperature, Hydric Environment, and Prior Pathogen Exposure Alter the Experimental Severity of Chytridiomycosis in Boreal Toads.” Diseases of Aquatic Organisms 95(1): 31–42.
- Nazir, J., Spengler, M., Marschang, R., E. 2012. “Environmental Persistence of Amphibian and Reptilian Ranaviruses.” Diseases of Aquatic Organisms 98(3): 177–84.
- Nichols, D., K., Lamirande, E., W., Pessier, A., P., Longcore, J., E. 2001. “Experimental Transmission of Cutaneous Chytridiomycosis in Dendrobatid Frogs.” Source Journal of Wildlife Diseases Wildlife Disease Association Journal of Wildlife Diseases 37(371): 1–11.
- Ohst, T., Gräser, Y., Plötner, J. 2013. “*Batrachochytrium Dendrobatidis* in Germany: Distribution, Prevalences, and Prediction of High Risk Areas.” Diseases of Aquatic Organisms 107(1): 49–59.
- Ouellet, M., Mikaelian, I., Pauli, B., D., Rodrigue, J., Green, D. 2005. “Historical Evidence of Widespread Chytrid Infection in North American Amphibian Populations.” Conservation Biology 19(5): 1431–40.
- Patrelle, C., Miaud, C., Cristina, N., Kulberg, P., Merilä, J. 2012. “Chytrid Fungus Screening in a Population of Common Frogs from Northern Finland.” Herpetological Review 43(3): 422–25.
- Piotrowski, J., S., Annis, S., L., Longcore, J., E. 2004. “Physiology of *Batrachochytrium Dendrobatidis*, a Chytrid Pathogen of Amphibians.” Mycologia 96(1): 9–15.
- Rachowicz, L., J., Vredenburg, V., T. 2004. “Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and Between Amphibian Life Stages.” Diseases Of Aquatic Organisms 61(1-2): 75–83.
- Reshetnikov, A., N., Chestnut, T., Brunner, J., L., Charles, K., Nebergall, E., E., Olson, D., H. 2014. “Detection of the Emerging Amphibian Pathogens *Batrachochytrium Dendrobatidis* and Ranavirus in Russia.” Diseases of Aquatic Organisms 110(3): 235–40.
- Robert, J., Morales, H., Buck, W., Cohen, N., Marr, S., Gantress, J. 2005. “Adaptive

- Immunity and Histopathology in Frog Virus 3-Infected *Xenopus*.” *Virology* 332(2): 667–75.
- Rollins-Smith, L., A. 2009. “The Role of Amphibian Antimicrobial Peptides in Protection of Amphibians from Pathogens Linked to Global Amphibian Declines.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788(8): 1593–99.
- Rollins-Smith, L., A., Ramsey, J., P., Pask, J., D., Reinert, L., K., Woodhams, D., C. 2011. “Amphibian Immune Defenses against Chytridiomycosis: Impacts of Changing Environments.” *Integrative and Comparative Biology* 51(4): 552–62.
- Rosenblum, E., B., Stajich, J., E., Maddox, N., Eisen, M., B. 2008. “Global Gene Expression Profiles for Life Stages of the Deadly Amphibian Pathogen *Batrachochytrium Dendrobatidis*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(44): 17034.
- Savage, A., E., Zamudio, K., R. 2016. “Adaptive Tolerance to a Pathogenic Fungus Drives Major Histocompatibility Complex Evolution in Natural Amphibian Populations.”
- Schloss, Patrick D. et al. 2009. “Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities.” *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7537–41.
- Schneider, D., S., Ayres, J., S. 2008. “Two Ways to Survive Infection: What Resistance and Tolerance Can Teach Us about Treating Infectious Diseases.” *Nature Reviews Immunology* 8(11): 889–95.
- Seyedmousavi, S., Guillot, J., de Hoog, G., S. 2013. “Phaeohyphomycoses, Emerging Opportunistic Diseases in Animals.” *Clinical Microbiology Reviews* 26(1): 19–35.
- Shapard, E., J., Moss, A., S., San Francisco, M., J. 2011. “*Batrachochytrium Dendrobatidis* Can Infect and Cause Mortality in the Nematode *Caenorhabditis elegans*.” *Mycopathologia*: 1–6.
- Shin, J., Bataille, A., Kosch, T., A., Waldman, B. 2014. “Swabbing Often Fails to Detect Amphibian Chytridiomycosis under Conditions of Low Infection Load.” *PLoS ONE* 9(10).
- Skerratt, L., F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K., R., Phillott, A., D., Hines, H., B., Kenyon, N. 2007. “Spread of Chytridiomycosis Has Caused the Rapid Global Decline and Extinction of Frogs.” *EcoHealth* 4(2): 125–34.
- der Sluijs, A., Spikmans, F., Bosman, W., de Zeeuw, M., van der Meij, T., Goverse, E., Kik, M., Pasmans, S., Martel, A. 2013. “Rapid Enigmatic Decline Drives the Fire Salamander

(*Salamandra Salamandra*) to the Edge of Extinction in the Netherlands.” *Amphibia-Reptilia* 34: 233.

Stice, M., J., Briggs, C., J. 2010. “Immunization Is Ineffective At Preventing Infection and Mortality Due To the Amphibian Chytrid Fungus *Batrachochytrium Dendrobatidis*.” 46(1): 70–77.

Sura, P., Janulis, E., Profus, P. 2010. “Chytridiomycosis – a Mortal Danger for Amphibians.” *Chronmy Przyn. Ojcz.* 66(6): 406–21.

Taylor, S., K., Williams, E., S., Pier, A., C., Mills, K., W., Bock, M., D. 1999. “Mucormycotic Dermatitis in Captive Adult Wyoming Toads.” *Journal of wildlife diseases* 35(1): 70–74.

Teacher, A., G., F., Cunningham, A., A., Garner, T., W., J. 2010. “Assessing the Long-Term Impact of Ranavirus Infection in Wild Common Frog Populations.” *Animal Conservation* 13(5): 514–22.

Tedersoo, L., Bahram, M., Polme, S., Kõljalg, U., Yorou, N., S., Wijesundera, R., Ruiz, L., V., Vasco-Palacios, A., M., Thu, P., Q., Suija, A., Smith, M., E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkovsky, D., Pritsch, K., Poldmaa, K., Piepenbring, M., Phosri, C., Peterson, M. Parts, K., Partel, K., Otsing, E., Nouhra, E., Njouonkou, A., L., Nilsson, R., H., Morgado, L., N., Mayor, J., May, T., W., Majuakim, L., Lodge, D., J., Lee, S., S., Larsson, K.-H., Kohout, P., Hosaka, K., Hiiesalu, I., Henkel, T., W., Harend, H., Guo, L.-d., Greslebin, A., Grelet, G., Geml, J., Gates, G., Dunstan, W., Dunk, C., Drenkhan, R., Dearnaley, J., De Kesel, A., Dang, T., Chen, X., Buegger, F., Brearley, F., Q. Bonito, G., Anslan, S., Abell, S., Abarenkov, K. 2014. “Global Diversity and Geography of Soil Fungi.” *Science* 346(6213): 1256688–1256688.

Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, H., Hildebrand, F., Bork, P., Abarenkov, K. 2015. “Shotgun Metagenomes and Multiple Primer Pair-Barcode Combinations of Amplicons Reveal Biases in Metabarcoding Analyses of Fungi.” *MycoKeys* 10: 1–43.

Terlizzi, A., Benedetti-Cecchi, L., Bevilacqua, S., Fraschetti, S., Guldetti, P., Anderson, M., J. 2005. “Multivariate and Univariate Asymmetrical Analyses in Environmental Impact Assessment: A Case Study of Mediterranean Subtidal Sessile Assemblages.” *Marine Ecology Progress Series* 289: 27–42.

- Uller, T., Isaksson, C., Olsson, M. 2006. "Immune Challenge Reduces Reproductive Output and Growth in a Lizard." *Functional Ecology* 20(5): 873–79.
- Van Rooij, P., Martel, A., D'Herde, K., Brutyn, M., Croubels, S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F. 2012. "Germ Tube Mediated Invasion of *Batrachochytrium Dendrobatidis* in Amphibian Skin Is Host Dependent." *PLoS ONE* 7(7): 1–8.
- Van Rooij, P., Martel, A., Haesebrouck, F., Pasmans, F. 2015. "Amphibian Chytridiomycosis: A Review with Focus on Fungus-Host Interactions." *Veterinary Research* 46(1): 1–22.
- Rosa, I., D., Simoncelli, F., Fagotti, A., Pascolini, R. 2007. "Ecology: The Proximate Cause of Frog Declines?" *Nature* 447(7144): E4–5.
- Webster, J., P., Woolhouse, M., E., J. 1999. "Cost of Resistance: Relationship between Reduced Fertility and Increased Resistance in a Snail—schistosome Host—parasite System." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266(1417): 391.
- Weldon, C., du Preez, L., H., Hyatt, A., D., Muller, R., Speare, R. 2004. "Origin of the Amphibian Chytrid Fungus." *Emerging Infectious Diseases* 10(12): 2100–2105.
- Woodhams, D., C., Bosch, J., Briggs, C., J., Cashins, S., Davis, L., R., Lauer, A., Muths, E., Puschendorf, R., Schmidt, B., R., Sheafor, B., Voyles, J. 2011. "Mitigating Amphibian Disease: Strategies to Maintain Wild Populations and Control Chytridiomycosis." *Frontiers in zoology* 8(1): 8.
- Woodhams, D., C., Bigler, L., Marschang, R. 2012. "Tolerance of Fungal Infection in European Water Frogs Exposed to *Batrachochytrium Dendrobatidis* after Experimental Reduction of Innate Immune Defenses." *BMC Veterinary Research* 8(1): 197.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R., Skerratt, L., F. 2007. "Electrolyte Depletion and Osmotic Imbalance in Amphibians with Chytridiomycosis." *Diseases of Aquatic Organisms* 77(2): 113–18.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W., F., Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R., A., Skerratt, L., F., Speare, R. 2009. "Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines." *Science (New York, N.Y.)* 326(5952): 582–85.

## **Kasutatud veebiaadressid**

Bd-maps, 2016; Global Bd Mapping project veebileht. Veebiaadress: <http://www.bd-maps.net/surveillance/> ; külastatud: 23.05.2016

IUCN-ASG International Union for Conservation of Nature- Amphibian Specialist Group (2016) veebileht. Veebiaadress: [www.amphibians.org](http://www.amphibians.org) ; külastatud 21.05.2016.

RTS-LKS, 2016; Riigi teataja seadus, alampeatükk Looduskaitse seadus veebileht: <https://www.riigiteataja.ee/akt/13338169#para10lg3>, külastatud 10.05.2016

NCBI, Genbank; National Center for Biotechnology Information veebileht: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. külastatud: 03.03.2016–25.05.2016



## **Tänu sõnad**

Aitäh juhendajatele Lehole ja Riinule soovitude, nõuannete ning abi eest.

Aitäh looduskaitsebioloogia töörühma liikmetele abi eest proovide korjamisel.

Aitäh Indrek, abi ja nõuannete eest statistilise analüüsi sooritamisel.

Aitäh Sten, bioinformaatika alaste õpetuste ja abi eest.

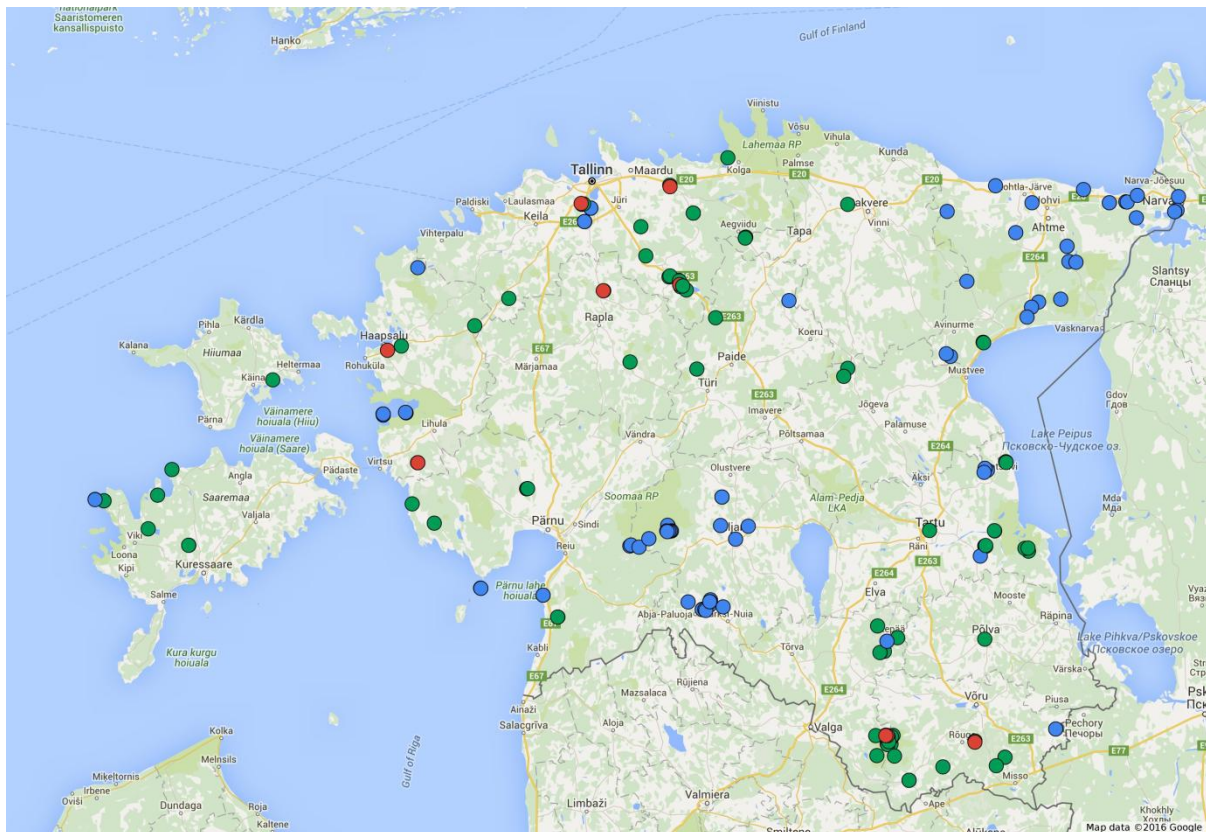
Aitäh Ingrid, nõuannete ja abi eest laboratoorses töös.

Aitäh Jenny, hea seltskonna ja abi eest laboratoorse töö tegemisel.

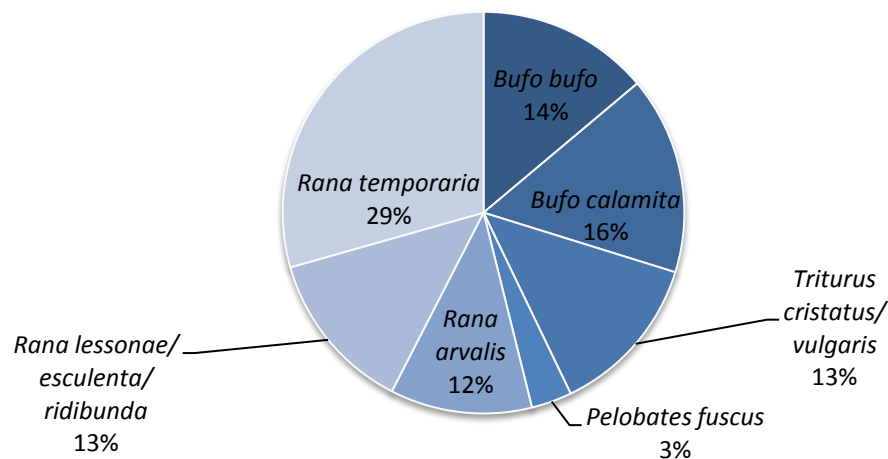
Aitäh perekonnale, kaasaelamise ja vankumatu toe eest.

Aitäh elukaaslasele, et oled olemas!

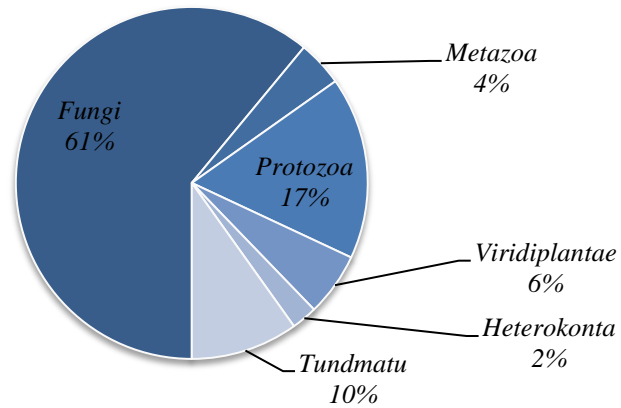
## Lisad



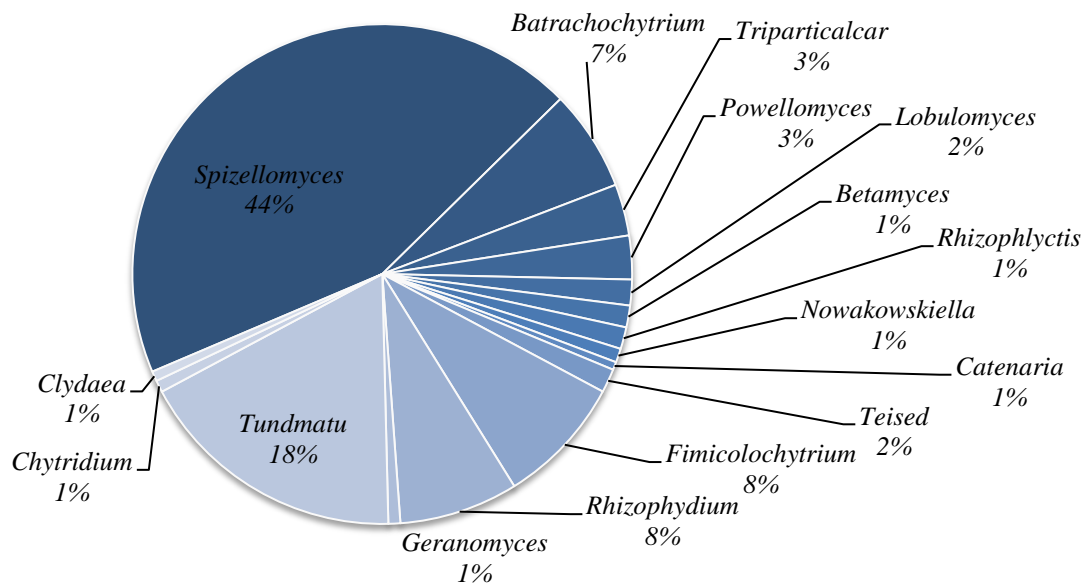
Joonis 5 Kogutud proovide kaart. Sinised täpid on 2014 aastal korjatud proovid, rohelised täpid on 2015 aastal korjatud proovid ja punased täpid on sekveneerimistulemuste põhiselst Bd positiivsed proovid



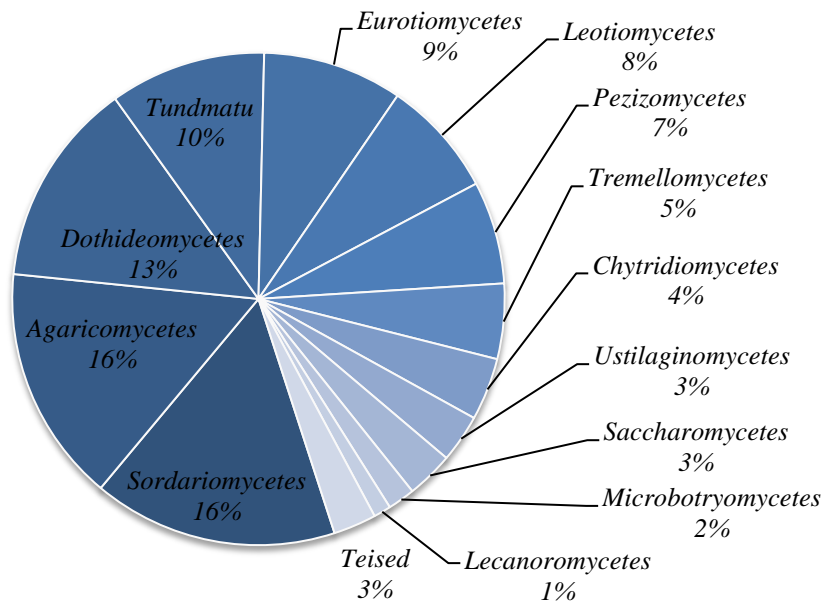
Joonis 6 Kahepaiksete liigiline jaotuvus looduslikust keskkonnast kogutud proovide hulgas



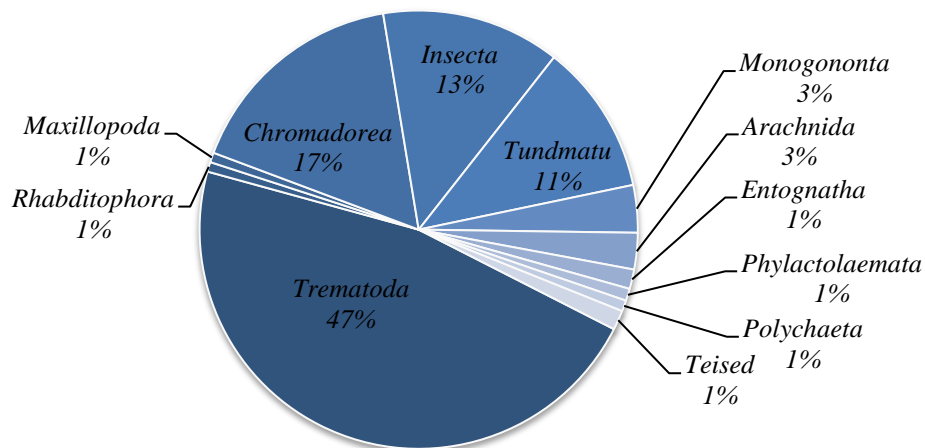
Joonis 7 Kõigi sekveneeritud OTU-de protsentuaalne jaotuvus. Grupp Tundmatu tähistab OTU-si, mida ei olnud võimalik määrata riigi tasemel.



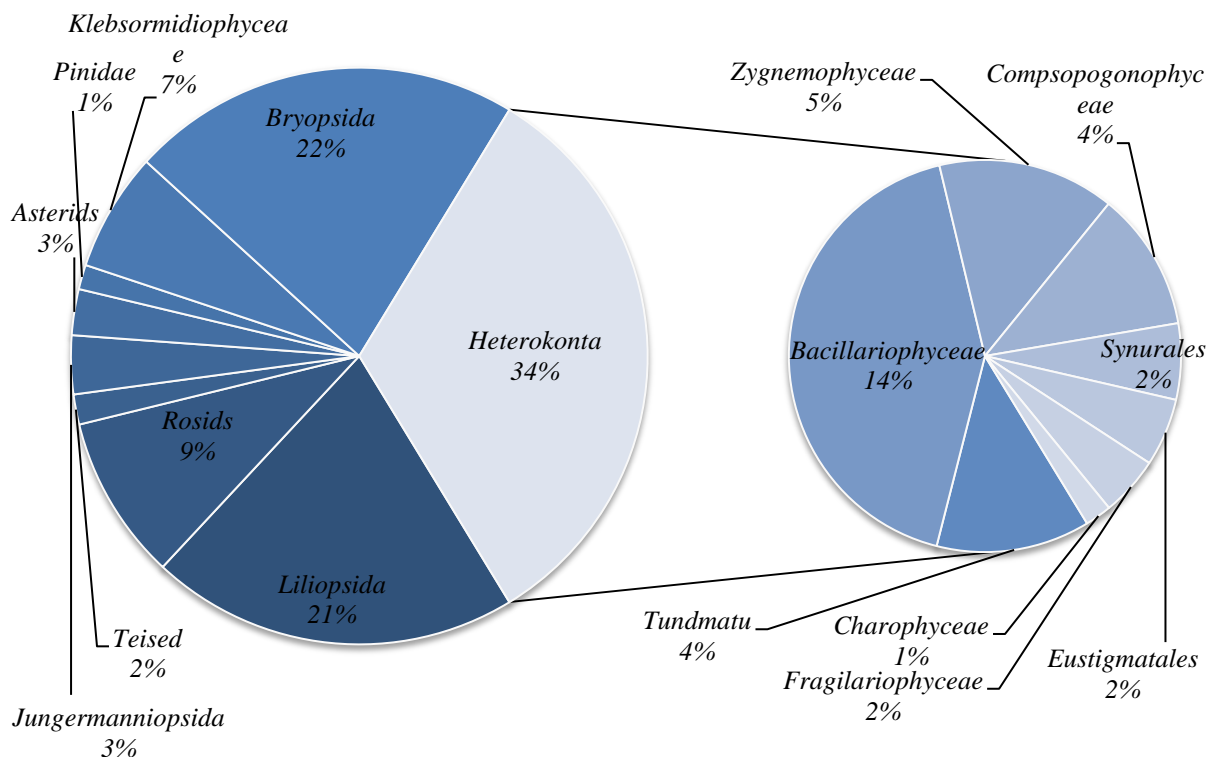
Joonis 8 Hõimkonna viburseened jaotuvus perekonna tasemel. Gruppi Tundmatu, kuuluvad OTU-d, mis suudeti määrata hõimkonna tasemele. Gruppi Teised kuuluvad klassid: *Angulomyces*, *Arkaya*, *Coralloidiomyces*, *Operculomyces*, *Sonoraphlyctis*- kõigil neil esines kaks vastet.



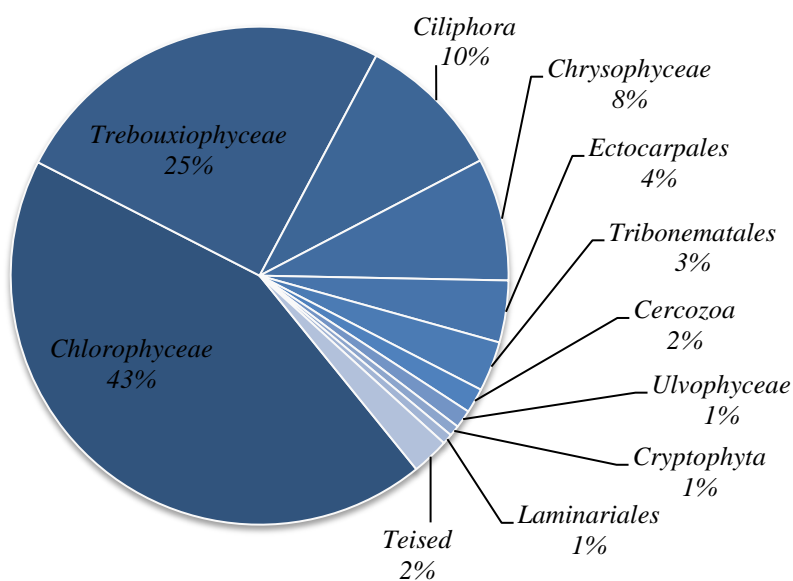
Joonis 9 Grupi Seened jaotuvus klasside tasemel. Gruppi *Tundmatu*, kuuluvad OTU-d, mida suudeti määrata hõimkonna tasemele. Gruppi *Teised* kuuluvad klassid, mille hulk protsendiliselt oli < 1%: *Pucciniomycetes*, *Orbiliomycetes*, *Agaricostilbomycetes*, *Exobasidiomycetes*, *Wallemiomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Glomeromycetes*, *Taphrinomycetes*, *Pleosporales*, *Archaeorhizomycetes*, *Monoblepharidomycetes*, *Blastocladiomycetes*, *Capnodiales*, *Arthoniomycetes*, *Atractiellomycetes*, *Agaricomycotina*, *Mucoromycotina*, *Chaetothyriales*, *Eurotiales*, *Exobasidiales*, *Mortierellales*.



Joonis 10 Grupi loomad jaotuvus klassilisel tasemel. Gruppi *Tundmatu* kuuluvad hõimkonna tasemele määratud OTU-d. Gruppi *Teised* kuuluvad klassid: *Clitellata*, *Catenulida*, *Anthozoa*.



Joonis 11 Grupi taimed jaotus klasside tasemel. Grupi vetikalised (*Heterokonta*) kuuluvad klassid eraldi välja toodud. Gruppi *Tundmatu* kuuluvad hõimkonna tasemele määratud OTU-d. Gruppi *Teised* kuuluvad klassid: *Polytrichopsida*, *Caryophyllales*, *Magnoliopsida*, *Coscinodiscophyceae*, *Embryophyta*



Joonis 12 Grupi protistid jaotus klasside tasemel. Gruppi *Teised* kuuluvad klassid mille protsentuaalne hulk on alla 1%: *Dinophyceae*, *Apicomplexa*, *Sphacelariales*, *Labyrinthulomycetes*, *Phyllariaceae*, *Raphidophyceae*, *Prasinophytes*, *Katablepharidophyta*, *Fucales*, *Ichthyosporea*, *Oomycetes*, *Pedinophyceae*, *Tilopteridales*, *Chlorodendrophyceae*, *Chlorophyta*

Tabel 1 Kogutud proovide tabel. Kõik kogutud proovid on esitatud alljärgnevas tabelis. Proovid on kogutud looduslikust elukeskkonnast (LKK), Tallinna loomaaia (Tln\_Zoo), Riia loomaaia (Riga\_Zoo) ning koduloomana peetud kahepaiksetelt (Koduloom). Liikidel *Bufo calamita*, *Pelobates fuscus* ja *Triturus cristatus* on X ja Y koordinaat asendatud üldisema asukoha määratlusega Looduskaitse seadusest tulenevatest piirangutest.

Proovi ID	Kuupäev	X koordinaat	Y koordinaat	Kahepaikse liik	Kahepaikse elupaik	<i>B. dendrobatidis</i> positiivne	Eemaldatud analüüsides	Teostatud qPCR
AP 001	16.04.2015	24,8228	59,1096	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK	+		+
AP 002	23.04.2015	25,2042	59,1510	<i>Rana temporaria</i>	LKK			+
AP 003	25.04.2015	25,2042	59,1510	<i>Rana temporaria</i>	LKK		+	+
AP 004	25.04.2015	25,2042	59,1510	<i>Rana temporaria</i>	LKK			+
AP 005	25.04.2015	25,2042	59,1510	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			+
AP 006	25.04.2015	25,3459	59,3418	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 007	25.04.2015	25,3459	59,3418	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 008	25.04.2015	25,3459	59,3418	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 009	25.04.2015	25,3459	59,3418	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 010	25.04.2015	25,3459	59,3418	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 011	25.04.2015	25,2080	59,4239	<i>Rana arvalis</i>	LKK			+
AP 012	25.04.2015	25,2080	59,4239	<i>Rana arvalis</i>	LKK			+
AP 013	25.04.2015	25,2080	59,4239	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 014	25.04.2015	25,2080	59,4239	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 015	25.04.2015	25,2080	59,4239	<i>Rana arvalis</i>	LKK	+		+
AP 016	2.05.2015	26,6063	57,6107	<i>Rana temporaria</i>	LKK			+
AP 017	11.04.2015	26,2471	59,3678	<i>Rana temporaria</i>	LKK			+
AP 018	11.04.2015	24,6946	59,3678	<i>Rana temporaria</i>	LKK	+		+
AP 019	25.04.2015	Alu, Pärnumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 020	25.04.2015	Alu, Pärnumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 021	25.04.2015	23,7356	58,5906	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 022	25.04.2015	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 023	26.04.2015	22,3980	58,3382	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			+
AP 024	26.04.2015	22,3976	58,3381	<i>Rana temporaria</i>	LKK			+
AP 025	26.04.2015	Harilaid, Saaremaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 026	26.04.2015	Harilaid, Saaremaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 027	26.04.2015	21,9023	58,4741	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 028	26.04.2015	Kuumi, Saaremaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 029	27.04.2015	Lavassaare, Pärnumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 030	27.04.2015	Lavassaare, Pärnumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 031	4.05.2015	Võiduküla, Pärnumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 032	4.05.2015	Võiduküla, Pärnumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			+
AP 033	16.05.2015	24,7045	59,3692	<i>Rana temporaria</i>	LKK			+
AP 034	22.05.2015	27,0484	58,3365	<i>Rana temporaria</i>	LKK			+
AP 035	22.05.2015	27,0484	58,3365	<i>Rana arvalis</i>	LKK			+
AP 036	22.05.2015	27,0535	58,3355	<i>Rana arvalis</i>	LKK			+
AP 037	22.05.2015	27,0535	58,3355	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+

AP 038	16.06.2015	26,3025	57,4413	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 039	16.06.2015	Karula, Võrumaa		<i>Triturus cristatus</i>	LKK			+
AP 040	17.06.2015	26,5029	57,7441	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 041	17.06.2015	26,4840	57,7468	<i>Rana arvalis</i>	LKK	+		+
AP 042	17.06.2015	26,4872	57,7468	<i>Rana temporaria</i>	LKK		+	+
AP 043	17.06.2015	26,4785	57,7322	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			+
AP 044	18.06.2015	26,5129	57,7511	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 045	19.06.2015	26,4180	57,6882	<i>Rana arvalis</i>	LKK		+	+
AP 046	19.06.2015	Lohusuu, Ida-Virumaa		<i>Pelobates fuscus</i>	LKK			+
AP 047	19.06.2015	26,8036	57,6526	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 048	19.06.2015	26,9910	57,7338	<i>Rana lessonae</i>	LKK	+		+
AP 049	19.06.2015	26,9910	57,7338	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 050	20.06.2015	Lohusuu, Ida-Virumaa		<i>Pelobates fuscus</i>	LKK			+
AP 051	20.06.2015	Lohusuu, Ida-Virumaa		<i>Pelobates fuscus</i>	LKK			+
AP 052	21.06.2015	27,1666	57,6827	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 053	21.06.2015	27,1665	57,6827	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			+
AP 054	21.06.2015	27,1150	57,6565	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 055	11.07.2015	26,2471	58,8759	<i>Bufo bufo</i>	LKK			+
AP 056	13.06.2015	26,4805	57,7226	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 057	13.06.2015	Karula, Võrumaa		<i>Pelobates fuscus</i>	LKK			+
AP 058	13.06.2015	Karula, Võrumaa		<i>Pelobates fuscus</i>	LKK			+
AP 059	13.06.2015	Karula, Võrumaa		<i>Pelobates fuscus</i>	LKK			+
AP 060	13.06.2015	26,4805	57,7226	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 061	14.06.2015	26,4805	57,7226	<i>Rana temporaria</i>	LKK			+
AP 062	14.06.2015	26,4805	57,7226	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 063	16.06.2015	26,4805	57,7226	<i>Rana lessonae</i>	LKK			+
AP 064	16.06.2015	26,4805	57,7226	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 065	15.06.2015	26,5031	57,7470	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 066	15.06.2015	Karula, Võrumaa		<i>Pelobates fuscus</i>	LKK			
AP 067	16.06.2015	26,4112	57,7502	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 068	16.06.2015	26,4841	57,7470	<i>Rana temporaria</i>	LKK	+		+
AP 069	15.06.2015	Karula, Võrumaa		<i>Pelobates fuscus</i>	LKK	+		+
AP 070	16.06.2015	26,4882	57,7310	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 071	30.05.2015	27,1057	58,3820	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 072	23.06.2015	26,6067	57,6108	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 073	30.05.2015	27,1046	58,3830	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 074	23.06.2015	26,6067	57,6108	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 075	23.06.2015	26,6067	57,6108	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 076	20.05.2015	27,1725	58,5933	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 077	20.05.2015	27,1712	58,5929	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 078	20.05.2015	27,1732	58,5914	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 079	21.08.2015	26,2243	58,8520	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 080	6.08.2015	25,6513	59,2700	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 081	6.08.2015	25,6494	59,2673	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 082	6.08.2015	25,6494	59,2673	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 083	3.08.2015	26,6067	57,6108	<i>Rana temporaria</i>	LKK			

AP 084	18.07.2015	22,8881	58,8418	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 085	30.07.2015	26,6059	57,6109	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 086	31.07.2015	26,6066	57,6107	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 087	20.08.2015	23,7027	58,4651	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 088	19.08.2015	23,8317	58,4057	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 089	8.07.2015	1,5518	42,6261	<i>Bufo bufo</i>	LKK		+	
AP 090	21.08.2015	14,9652	55,2102	<i>Bufo bufo</i>	LKK		+	
AP 091	26.09.2015	22,2990	58,5695	<i>Bufo bufo</i>	LKK		+	
AP 092	11.09.2015	26,4221	58,0905	<i>Rana temporaria</i>	LKK		+	
AP 093	11.09.2015	26,5382	58,0541	<i>Rana temporaria</i>	LKK		+	
AP 094	13.09.2015	26,5206	57,6867	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 095	14.09.2015	26,4626	58,0119	<i>Rana arvalis</i>	LKK		+	
AP 096	14.09.2015	26,4373	58,0081	<i>Rana temporaria</i>	LKK		+	
AP 097	14.09.2015	26,4362	58,0078	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 098	5.09.2015	27,0486	58,0493	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 099	25.09.2015	22,2154	58,4914	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 100	8.06.2015	25,4755	59,0282	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 101	9.06.2015	25,2648	59,1390	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 102	18.05.2015	25,0674	59,2139	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK		+	
AP 103	26.05.2015	23,5587	58,9311	<i>Rana arvalis</i>	LKK	+		
AP 104	25.05.2015	23,7358	58,5906	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 105	18.05.2015	25,0392	59,3008	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 106	9.06.2015	25,2662	59,1284	<i>Rana temporaria</i>	LKK	+		+
AP 107	23.05.2015	27,0537	58,3373	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 108	25.05.2015	24,2675	59,0861	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 109	23.05.2015	27,3032	58,3203	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 110	9.06.2015	25,2612	59,1405	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 111	8.06.2015	25,2708	59,1219	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 112	26.05.2015	26,7258	58,3841	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 113	8.06.2015	25,3043	59,1118	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 114	23.05.2015	27,2836	58,3293	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 115	9.06.2015	25,2097	59,1542	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 116	23.05.2015	27,3008	58,3294	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 117	9.06.2015	25,2649	59,1393	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 118	25.05.2015	24,0689	59,0048	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 119	26.05.2015	23,6399	58,9434	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 120	31.05.2015	25,5470	59,5057	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 121	8.06.2015	25,2842	59,1240	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 122	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Dendrobates leucomelas</i>	Tln_Zoo			+
AP 123	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Trachycephalus venulosus</i>	Tln_Zoo			+
AP 124	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Dyscophus guineti</i>	Tln_Zoo			+
AP 125	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Xenopus laevis</i>	Tln_Zoo			+
AP 126	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Bufo (Ingerophrynus) galeatus</i>	Tln_Zoo			+
AP 127	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Litoria caerulea</i>	Tln_Zoo			+
AP 128	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Trachycephalus resinifictrix</i>	Tln_Zoo			+
AP 129	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Polypedates otilophus</i>	Tln_Zoo			+



AP 130	17.09.2015	24,6595	59,4210	<i>Phyllobates vittatus</i>	Tln_Zoo			+
AP 131	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Trachycephalus nigromaculatus</i>	Riga_Zoo			+
AP 132	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates auratus</i>	Riga_Zoo			+
AP 133	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Trachycephalus resinifictrix</i>	Riga_Zoo			+
AP 134	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Bombina bombina</i>	Riga_Zoo			+
AP 135	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Hyla arborea</i>	Riga_Zoo	+		+
AP 136	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Rana arvalis</i>	Riga_Zoo			+
AP 137	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Rana temporaria</i>	Riga_Zoo			+
AP 138	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dyscophus antongilii</i>	Riga_Zoo			+
AP 139	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Pelodryas (litoria) caerulea</i>	Riga_Zoo	+		+
AP 140	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Lepidobatrachus laevis</i>	Riga_Zoo			+
AP 141	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Notophthalmus viridiscens</i>	Riga_Zoo			+
AP 142	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Mantella laevis</i>	Riga_Zoo			+
AP 143	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Trachycephalus resinifictrix</i>	Riga_Zoo			+
AP 144	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Polypedates (Rhacophorus) dennysi</i>	Riga_Zoo			+
AP 145	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Rhacophorus reinwardtii</i>	Riga_Zoo			+
AP 146	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Bufo quatturalis</i>	Riga_Zoo			+
AP 147	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Agalychnis callidryas</i>	Riga_Zoo			+
AP 148	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Ceratophrys cranwelli</i>	Riga_Zoo			+
AP 149	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Scaphiophryne marmorata</i>	Riga_Zoo			+
AP 150	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates tinctorius (Cobalt)</i>	Riga_Zoo			+
AP 151	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates auratus (green)</i>	Riga_Zoo			+
AP 152	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	Riga_Zoo			+
AP 153	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Amphiuma means</i>	Riga_Zoo			+
AP 154	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Bufo (Rhinella) marinus</i>	Riga_Zoo			+
AP 155	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Rhacophorus annamensis</i>	Riga_Zoo			+
AP 156	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Neurergus kaiserii</i>	Riga_Zoo			+
AP 157	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Pelobates fuscus</i>	Riga_Zoo			+
AP 158	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates tinctorius (Patricia)</i>	Riga_Zoo			+
AP 159	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Phyllobates vittatus</i>	Riga_Zoo			+
AP 160	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates tinctorius (Auratus)</i>	Riga_Zoo		+	+
AP 161	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Theloderma corticale</i>	Riga_Zoo			+
AP 162	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Rana (Pelophylax) esculenta</i>	Riga_Zoo			+
AP 163	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates auratus (blue)</i>	Riga_Zoo			+
AP 164	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Rana (Pelophylax) ridibunda</i>	Riga_Zoo			+
AP 165	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Theloderma bicolor</i>	Riga_Zoo			+
AP 166	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Bombina microdeladigitata</i>	Riga_Zoo			+
AP 167	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Triturus cristatus</i>	Riga_Zoo			+
AP 168	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Bombina bombina</i>	Riga_Zoo			+
AP 169	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Agalychnis moreletii</i>	Riga_Zoo			+
AP 170	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates leucomelas</i>	Riga_Zoo			+
AP 171	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Rhacophorus feae</i>	Riga_Zoo			+
AP 172	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Amietophrynus (bufo) garmani</i>	Riga_Zoo			+

AP 173	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Mantella betsileo</i>	Riga_Zoo			+
AP 174	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Lithobates vibicarius</i>	Riga_Zoo	+		+
AP 175	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Rana lessonae</i>	Riga_Zoo			+
AP 176	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Tylototriton verrucosus</i>	Riga_Zoo			+
AP 177	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Typhlonectes natans</i>	Riga_Zoo			+
AP 178	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Lissotriton cristatus cristatus</i>	Riga_Zoo			+
AP 179	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Bufo bufo</i>	Riga_Zoo			+
AP 180	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Bufo (pseudepidalea) viridis</i>	Riga_Zoo			+
AP 181	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Megophrys nasuta</i>	Riga_Zoo			+
AP 182	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Xenopus laevis borealis</i>	Riga_Zoo			+
AP 183	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Pelodryas (litoria) caerulea</i>	Riga_Zoo			+
AP 184	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates tinctorius (waterblue)</i>	Riga_Zoo			+
AP 185	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dyscophus guineti</i>	Riga_Zoo			+
AP 186	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Epipedobates tricolor</i>	Riga_Zoo			+
AP 187	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Dendrobates tinctorius (Alanis)</i>	Riga_Zoo			+
AP 188	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Pyxicephalus adspersus</i>	Riga_Zoo			+
AP 189	6.10.2015	24,1601	57,0067	<i>Bufo galeatus</i>	Riga_Zoo			+
AP 190	12.10.2015	23,8352	58,6869	<i>Pyxicephalus edulis</i>	Koduloom			+
AP 191	12.10.2015	23,8352	58,6869	<i>Ceratophrys ornata</i>	Koduloom			
AP 192	11.06.2015	24,8242	59,1095	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 193	2.05.2015	24,8228	59,1095	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 194	29.04.2015	24,8229	59,1097	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 195	30.04.2015	24,8231	59,1095	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 196	2.05.2015	24,8243	59,1095	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 197	29.04.2015	24,8240	59,1099	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 198	11.08.2015	24,8223	59,1105	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 199	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 200	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 201	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 202	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 203	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 204	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 205	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 206	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 207	12.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 208	13.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 209	13.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 210	13.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 211	13.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 212	13.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 213	13.05.2014	Männiku, Harjumaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 214	16.05.2014	Nõva, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 215	17.05.2014	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 216	17.05.2014	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			

AP 217	17.05.2014	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK	+		
AP 218	17.05.2014	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 219	17.05.2014	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK	+		
AP 220	17.05.2014	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 221	17.05.2014	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 222	18.05.2014	23,5327	58,7385	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 223	18.05.2014	Saastna, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 224	18.05.2014	Saastna, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 225	18.05.2014	23,5343	58,7351	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 226	18.05.2014	24,4680	58,1852	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 227	18.05.2014	24,4679	58,1852	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 228	18.05.2014	24,4681	58,1854	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 229	18.05.2014	24,4683	58,1853	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 230	20.05.2014	27,0630	58,5678	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 231	20.05.2014	27,0504	58,5733	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 232	20.05.2014	27,0504	58,5733	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 233	20.05.2014	27,0439	58,5610	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 234	21.05.2014	27,0228	58,3050	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 235	12.07.2014	24,1024	58,2071	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 236	14.07.2014	24,1042	58,2065	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 237	14.07.2014	24,1042	58,2063	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 238	25.07.2014	21,8511	58,4783	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 239	25.07.2014	21,8508	58,4781	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 240	4.07.2014	25,9046	59,0804	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 241	5.07.2014	26,9434	59,1380	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 242	6.07.2014	27,3627	59,0761	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 243	6.07.2014	27,3222	59,0606	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 244	6.07.2014	27,2952	59,0306	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 245	5.07.2014	27,3244	59,3721	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 246	8.07.2014	27,5292	59,2425	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 247	10.07.2014	27,4921	59,0844	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 248	11.07.2014	27,5394	59,1968	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 249	11.07.2014	27,5817	59,1946	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 250	11.07.2014	27,6256	59,4113	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 251	12.07.2014	27,7761	59,3727	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 252	12.07.2014	27,7761	59,3727	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 253	12.07.2014	27,8716	59,3751	<i>Rana lessonae</i>	LKK			
AP 254	12.07.2014	27,8810	59,3746	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 255	12.07.2014	27,9391	59,3939	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 256	12.07.2014	28,1796	59,3909	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 257	12.07.2014	27,9339	59,3277	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 258	13.07.2014	27,2296	59,2835	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 259	13.07.2014	27,1109	59,4227	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 260	14.07.2014	26,8287	59,3466	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 261	15.07.2014	26,8480	58,9125	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 262	15.07.2014	26,8232	58,9202	<i>Bufo bufo</i>	LKK			

AP 263	17.07.2014	28,1710	59,3503	<i>Rana ridibundus</i>	LKK			
AP 264	17.07.2014	28,1581	59,3459	<i>Rana ridibundus</i>	LKK			
AP 265	17.07.2014	28,1581	59,3459	<i>Rana ridibundus</i>	LKK			
AP 266	3.06.2014	23,5327	58,7386	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 267	3.06.2014	Saastna, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 268	3.06.2014	Saastna, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 269	3.06.2014	Saastna, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			
AP 270	10.07.2014	23,6674	58,7421	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 271	10.07.2014	23,6651	58,7431	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 272	14.07.2014	25,4081	58,1419	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 273	17.07.2014	25,4081	58,1419	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 274	31.08.2014	25,4081	58,1419	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 275	6.09.2014	27,4631	57,7711	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 276	6.09.2014	27,4631	57,7711	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 277	18.08.2014	25,4405	58,1537	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 278	22.07.2014	25,3981	58,1419	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 279	26.08.2014	25,3972	58,1412	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 280	17.08.2014	25,4130	58,1412	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 281	17.08.2014	25,4176	58,1385	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 282	20.08.2014	25,3159	58,1642	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 283	21.08.2014	25,4462	58,1706	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 284	16.08.2014	25,4430	58,1649	<i>Rana temporaria</i>	LKK		+	
AP 285	16.08.2014	25,4447	58,1648	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 286	5.09.2014	25,4447	58,1648	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 287	20.08.2014	25,4413	58,1649	<i>Bufo bufo</i>	LKK		+	
AP 288	20.08.2014	25,4413	58,1649	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 289	14.07.2014	25,5933	58,3574	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 290	3.09.2014	25,6670	58,3968	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 291	29.08.2014	25,5046	58,3985	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 292	29.08.2014	25,5046	58,3985	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 293	6.09.2014	25,5193	58,1491	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 294	14.07.2014	25,5129	58,4856	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 295	20.08.2014	25,5129	58,4856	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 296	20.08.2014	25,5129	58,4856	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 297	3.09.2014	25,5129	58,4856	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 298	3.09.2014	25,5129	58,4856	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 299	12.05.2014	25,1989	58,3981	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 300	12.05.2014	25,1961	58,3998	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 301	4.06.2014	24,9749	58,3361	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 302	4.06.2014	24,9815	58,3393	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 303	4.06.2014	25,0283	58,3327	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 304	5.06.2014	25,2179	58,3821	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 305	5.06.2014	25,2173	58,3822	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 306	5.06.2014	25,2109	58,3817	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 307	5.06.2014	25,2027	58,3809	<i>Triturus vulgaris</i>	LKK			
AP 308	5.06.2014	25,0863	58,3589	<i>Rana arvalis</i>	LKK			

AP 309	18.06.2014	26,4776	58,0430	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 310	18.06.2014	26,4776	58,0430	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 311	18.06.2014	26,4776	58,0430	<i>Bufo bufo</i>	LKK			
AP 312	25.06.2014	25,1908	58,3822	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 313	25.06.2014	25,1932	58,3805	<i>Rana arvalis</i>	LKK			
AP 314	8.07.2014	27,5292	59,2425	<i>Rana temporaria</i>	LKK			
AP 315	17.05.2014	Vatla, Läänemaa		<i>Bufo calamita</i>	LKK			

Tabel 2 Töös kasutatud ITS4ngs praimerid. Amph 5-7 erinevad sekveneerimisprojektid.

Proovi number	Praimer	Praimeri järjestus	
AP 001; AP 106; AP 211	ITS4ngsUni_001	ACGAGTGCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 002; AP 107; AP 212	ITS4ngsUni_002	ACGCTCGACACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 003; AP 108; AP 213	ITS4ngsUni_003	AGACGCACTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 004; AP 109; AP 214	ITS4ngsUni_008	ACTCGCGTGTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 005; AP 110; AP 215	ITS4ngsUni_011	ATGATACGTCTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 006; AP 111; AP 216	ITS4ngsUni_014	ACGAGAGATACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 007; AP 112; AP 217	ITS4ngsUni_015	ATACGACGTACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 008; AP 113; AP 218	ITS4ngsUni_016	ATCACGTACTACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 009; AP 114; AP 219	ITS4ngsUni_017	ACGTCTAGTACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 010; AP 115; AP 220	ITS4ngsUni_019	ATGTACTACTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 011; AP 116; AP 221	ITS4ngsUni_026	ACATACGCGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 012; AP 117; AP 222	ITS4ngsUni_028	ACTACTATGTCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 013; AP 118; AP 223	ITS4ngsUni_029	ACTGTACAGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 014; AP 119; AP 224	ITS4ngsUni_030	AGACTATACTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 015; AP 120; AP 225	ITS4ngsUni_032	AGTACGCTATCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 016; AP 121; AP 226	ITS4ngsUni_033	ATAGAGTACTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 017; AP 122; AP 227	ITS4ngsUni_034	ACACGCTACGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 018; AP 123; AP 228	ITS4ngsUni_035	ACAGTAGACGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 019; AP 124; AP 229	ITS4ngsUni_036	ACGACGTGACTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 020; AP 125; AP 230	ITS4ngsUni_037	ATACACACACTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 021; AP 126; AP 231	ITS4ngsUni_038	ATACACGTGATCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 022; AP 127; AP 232	ITS4ngsUni_039	ATACAGATCGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 023; AP 128; AP 233	ITS4ngsUni_040	ATACGCTGTCTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 024; AP 129; AP 234	ITS4ngsUni_041	ATAGTGTAGATCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 025; AP 130; AP 235	ITS4ngsUni_042	ATCGATCACGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 026; AP 131; AP 236	ITS4ngsUni_043	ATCGCACTAGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 027; AP 132; AP 237	ITS4ngsUni_044	ATCTAGCGACTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 028; AP 133; AP 238	ITS4ngsUni_046	ATGACGTATGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 029; AP 134; AP 239	ITS4ngsUni_047	ATGTGAGTAGTCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 030; AP 135; AP 240	ITS4ngsUni_048	AACAGTATATACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 031; AP 136; AP 241	ITS4ngsUni_050	ACTAGCAGTACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 032; AP 137; AP 242	ITS4ngsUni_052	AGTATACATACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 033; AP 138; AP 243	ITS4ngsUni_053	AGTCGAGAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 034; AP 139; AP 244	ITS4ngsUni_054	AGTGCTACGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 035; AP 140; AP 245	ITS4ngsUni_055	ACGATCGTATACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7

AP 036; AP 141; AP 246	ITS4ngsUni_056	ACGCAGTACGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 037; AP 142; AP 247	ITS4ngsUni_057	ACGCGTATACACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 038; AP 143; AP 248	ITS4ngsUni_058	ACGTACAGTCACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 039; AP 144; AP 249	ITS4ngsUni_059	ACGTACTCAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 040; AP 145; AP 250	ITS4ngsUni_061	ACTATAGCGTACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 041; AP 146; AP 251	ITS4ngsUni_062	ATACGTCATCACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 042; AP 147; AP 252	ITS4ngsUni_063	ATAGTCGCATACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 043; AP 148; AP 253	ITS4ngsUni_065	ATATGCTAGTACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 044; AP 149; AP 254	ITS4ngsUni_066	ATCACGCGAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 045; AP 150; AP 255	ITS4ngsUni_067	ATCGATAGTGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 046; AP 151; AP 256	ITS4ngsUni_068	ATCGCTGCGTACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 047; AP 152; AP 257	ITS4ngsUni_069	ATCTGACGTCACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 048; AP 153; AP 258	ITS4ngsUni_070	ATGAGTCAGTACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 049; AP 154; AP 259	ITS4ngsUni_071	ATGTAGTGTGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 050; AP 155; AP 260	ITS4ngsUni_072	ATGTCACACGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 051; AP 156; AP 261	ITS4ngsUni_073	ATGTCGTCGCACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 052; AP 157; AP 262	ITS4ngsUni_074	ACACATACGCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 053; AP 158; AP 263	ITS4ngsUni_077	ACGACAGCTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 054; AP 159; AP 264	ITS4ngsUni_078	ACGTCTCATCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 055; AP 160; AP 265	ITS4ngsUni_079	ACTCATCTACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 056; AP 161; AP 266	ITS4ngsUni_080	ACTCGCGCACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 057; AP 162; AP 267	ITS4ngsUni_081	AGAGCGTCACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 058; AP 163; AP 268	ITS4ngsUni_082	AGCGACTAGCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 059; AP 164; AP 269	ITS4ngsUni_083	AGTAGTGATCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 060; AP 165; AP 270	ITS4ngsUni_084	AGTGACACACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 061; AP 166; AP 271	ITS4ngsUni_085	AGTGTATGTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 062; AP 167; AP 272	ITS4ngsUni_086	ATAGATAGACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 063; AP 168; AP 273	ITS4ngsUni_087	ATATAGTCGCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 064; AP 169; AP 274	ITS4ngsUni_088	ATCTACTGACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 065; AP 170; AP 275	ITS4ngsUni_089	ACACGTAGATCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 066; AP 171; AP 276	ITS4ngsUni_090	ACACGTGTCGCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 067; AP 172; AP 277	ITS4ngsUni_091	ACATACTCTACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 068; AP 173; AP 278	ITS4ngsUni_092	ACGACACTATCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 069; AP 174; AP 279	ITS4ngsUni_093	ACGAGACGCGCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 070; AP 175; AP 280	ITS4ngsUni_094	ACGTATGCGACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 071; AP 176; AP 281	ITS4ngsUni_095	ACGTGATCTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 072; AP 177; AP 282	ITS4ngsUni_097	ACTAGTCACTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 073; AP 178; AP 283	ITS4ngsUni_098	ACTCTACGCTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 074; AP 179; AP 284	ITS4ngsUni_099	ACTGTACATACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 075; AP 180; AP 285	ITS4ngsUni_100	ATAGACTGCACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 076; AP 181; AP 286	ITS4ngsUni_102	ATAGCTCTATCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 077; AP 182; AP 287	ITS4ngsUni_103	ATATAGACATCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 078; AP 183; AP 288	ITS4ngsUni_104	ATATGATACGCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 079; AP 184; AP 289	ITS4ngsUni_105	ATCACTCATACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 080; AP 185; AP 290	ITS4ngsUni_106	ATCATCGAGTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 081; AP 186; AP 291	ITS4ngsUni_107	ATCGAGCTCTCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7

AP 082; AP 187; AP 292	ITS4ngsUni_108	ATCGCAGACACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 083; AP 188; AP 293	ITS4ngsUni_109	ATCTGTCTCGCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 084; AP 189; AP 294	ITS4ngsUni_110	ATGAGTGACGCCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 085; AP 190; AP 295	ITS4ngsUni_111	ATGATGTGTACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 086; AP 191; AP 296	ITS4ngsUni_112	ATGCTATAGACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 087; AP 192; AP 297	ITS4ngsUni_113	ATGCTCGCTACCCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 088; AP 193; AP 298	ITS4ngsUni_114	ACGTGCAGCGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 089; AP 194; AP 299	ITS4ngsUni_115	ACTCACAGAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 090; AP 195; AP 300	ITS4ngsUni_116	AGACTCAGCGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 091; AP 196; AP 301	ITS4ngsUni_117	AGAGAGTGTGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 092; AP 197; AP 302	ITS4ngsUni_118	AGCTATCGCGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 093; AP 198; AP 303	ITS4ngsUni_119	AGTCTGACTGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 094; AP 199; AP 304	ITS4ngsUni_120	AGTGAGCTCGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 095; AP 200; AP 305	ITS4ngsUni_121	ATAGCTCTCGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 096; AP 201; AP 306	ITS4ngsUni_122	ATCACGTGCGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 097; AP 202; AP 307	ITS4ngsUni_123	ATCGTAGCAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 098; AP 203; AP 308	ITS4ngsUni_124	ATCGTCTGTGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 099; AP 204; AP 309	ITS4ngsUni_126	ATGTGTCTAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 100; AP 205; AP 310	ITS4ngsUni_128	ACACTCGCACGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 101; AP 206; AP 311	ITS4ngsUni_129	ACAGACGTCTGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 102; AP 207; AP 312	ITS4ngsUni_131	ACGACAGCGAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 103; AP 208; AP 313	ITS4ngsUni_132	ACGATCTGTGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 104; AP 209; AP 314	ITS4ngsUni_135	ACGTGATGACGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
AP 105; AP 210; AP 315	ITS4ngsUni_136	ACTATGTACAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
NC_swab_Amph5; NC_swab_Amph6; NC_swab_Amph7	ITS4ngsUni_137	ACTCGATATAGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7
PosC_Amph5; PosC_Amph6; PosC_Amph7	ITS4ngsUni_138	ACTCGCACGCGACCTCCSCTTANTDATATGC	Amph5-7

Tabel 3 Kahepaiksete Bd haigestumise prevalents ja 95% usaldusvahemik

Liik	Bd positiivsed proovid	Proove kokku	Prevalents (%)	95% CI
<i>Bufo calamita</i>	2	39	5,1	0,0 12,1
<i>Pelobates fuscus</i>	1	8	12,5	0,0 35,4
<i>Rana arvalis</i>	3	28	10,7	0,0 22,2
<i>Rana lessonae</i>	1	32	3,1	0,0 9,2
<i>Rana temporaria</i>	3	72	4,2	0,0 8,8
<i>Triturus vulgaris</i>	1	32	3,1	0,0 9,2
Proovid Riia loomaaiast	3	59	5,1	0,0 10,7

Tabel 4 Kahepaiksete haigestumise prevalents perekonda *Mucor* ja 95% usaldusvahemik

Liik	<i>Mucor</i> positiivsed proovid	Proove kokku	Prevalents (%)	95% CI	
<i>Bufo bufo</i>	8	34	23,5	9,3	37,8
<i>Bufo calamita</i>	8	39	20,5	7,8	33,2
<i>Pelobates fuscus</i>	1	8	12,5	0,0	35,4
<i>Rana arvalis</i>	7	28	25,0	9,0	41,0
<i>Rana lessonae/esculenta/</i>	6	32	18,8	5,2	32,3
<i>Rana temporaria</i>	24	72	33,3	22,4	44,2
<i>Triturus vulgaris/cristatus</i>	2	32	6,3	0,0	14,6
Proovid Riia loomaaiaist	11	59	18,6	8,7	28,6

Tabel 5 Kahepaiksete haigestumise prevalents perekonda *Rhizopus* ja 95% usaldusvahemik

Liik	<i>Rhizopus</i> positiivsed proovid	Proove kokku	Prevalents (%)	95% CI	
<i>Bufo bufo</i>	1	34	2,9	0,0	8,6
<i>Bufo calamita</i>	3	39	7,7	0,0	16,1
<i>Rana lessonae/esculenta/</i>	2	32	6,3	0,0	14,6
<i>Rana temporaria</i>	1	72	1,4	0,0	4,1

Tabel 6 Kahepaiksete haigestumise prevalents perekonda *Phialophora* ja 95% usaldusvahemik

Liik	<i>Phialophora</i> positiivsed proovid	Proove kokku	Prevalents (%)	95% CI	
<i>Bufo bufo</i>	2	34	5,9	0,0	13,8
<i>Bufo calamita</i>	8	39	20,5	7,8	33,2
<i>Rana arvalis</i>	4	28	14,3	1,3	27,2
<i>Rana lessonae/esculenta/</i>	2	32	6,3	0,0	14,6
<i>Rana temporaria</i>	9	72	12,5	4,9	20,1
<i>Triturus vulgaris/cristatus</i>	5	32	15,6	3,0	28,2
Proovid Riia loomaaiaist	2	59	3,4	0,0	8,0



Tabel 7 Kahepaiksete haigestumise prevalents perekonna *Rhinocladium* ja 95% usaldusvahemik

Liik	<i>Rhinocladium</i> positiivsed proovid	Proove kokku	Prevalents (%)	95% CI	
<i>Rana temporaria</i>	3	72	4,2	0,0	8,8
Proovid Riia loomaaiaist	3	59	5,1	0,0	10,7
Proovid Tallinna loomaaiaist	2	9	22,2	0,0	49,4

Tabel 8 Kahepaiksete haigestumise prevalents perekonda *Venturiales* ja 95% usaldusvahemik

Liik	<i>Venturiales</i> positiivsed proovid	Proove kokku	Prevalents (%)	95% CI	
<i>Bufo bufo</i>	5	34	14,7	2,8	26,6
<i>Bufo calamita</i>	4	39	10,3	0,7	19,8
<i>Pelobates fuscus</i>	1	8	12,5	0,0	35,4
<i>Rana arvalis</i>	3	28	10,7	0,0	22,2
<i>Rana temporaria</i>	8	72	11,1	3,9	18,4
<i>Triturus vulgaris/cristatus</i>	7	32	21,9	7,6	36,2
Proovid Riia loomaaiaist	4	59	6,8	0,4	13,2

Tabel 9 Kahepaiksete haigestumise prevalents perekonda *Cladosporium* ja 95% usaldusvahemik

Liik	<i>Cladosporium</i> pk proovid	Proove kokku	Prevalents (%)	95% CI	
<i>Bufo bufo</i>	32	34	94,1	86,2	102,0
<i>Bufo calamita</i>	39	39	100,0	100,0	100,0
<i>Pelobates fuscus</i>	8	8	100,0	100,0	100,0
<i>Rana arvalis</i>	26	28	92,9	83,3	102,4
<i>Rana lessonae/esculenta/</i>	31	32	96,9	90,8	102,9
<i>Rana temporaria</i>	66	72	91,7	85,3	98,1
<i>Triturus vulgaris/cristatus</i>	28	32	87,5	76,0	99,0
Proovid Riia loomaaiaist	56	59	94,9	89,3	100,5
Proovid Tallinna loomaaiaist	9	9	100,0	100,0	100,0

Tabel 10 Keskkonna parameetrite ning organismide koosluste vahelise analüüsi tulemusel

<b>Elustikurühm, keskkonna parameeter</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup><sub>adj,cumul.</sub></b>	<b>F-väärtus</b>	<b>P-Väärtus</b>
<b>Protistid</b>				
Looduslik kk	0,01	0,01	3,42	0,001
<i>Bufo calamita</i>	0,01	0,02	2,18	0,001
<b>Seened</b>				
Looduslik kk	0,04	0,04	11,70	0,001
Aasta	0,02	0,06	6,53	0,001
<b>Bd</b>				
Looduslik kk	0,17	0,17	3,93	0,007

# Lihtlitsents

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Adele Puusalu

(sünnikuupäev: 02.08.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „*Batrachochytrium dendrobatidis*“ ja teised kahepaiksetel esinevad patogeensed seened ning nende levik Eestis“ ,mille juhendaja on Leho Tedersoo ja kaasjuhendaja on Riinu Rannap,
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016